

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EFEITO IN VITRO E IN VIVO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIAL
SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS PRESENTES EM ACESSÓRIOS
METÁLICOS ORTODÔNTICOS

Vitor Hugo Panhóca

SÃO CARLOS - SP
2015

Vitor Hugo Panhóca

**EFEITO IN VITRO E IN VIVO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIAL
SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS PRESENTES EM ACESSÓRIOS
METÁLICOS ORTODÔNTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em biotecnologia.

**Orientadores: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato
Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza**

SÃO CARLOS - SP

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar

P191ev Panhóca, Vitor Hugo.
 Efeito *in vitro* e *in vivo* da terapia fotodinâmica
antimicrobial sobre *streptococcus mutans* presentes em
acessórios metálicos ortodônticos / Vitor Hugo Panhóca. --
São Carlos : UFSCar, 2015.
 98 f.

 Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2015.

 1. Terapia fotodinâmica. 2. *Streptococcus mutans*. 3.
Curcumina. 4. Surfactante. 5. Aparelhos ortodônticos. I.
Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Vitor Hugo Panhóca

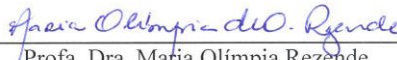
Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 07/05/2015

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza (Orientador)
(UFSCar)



Profa. Dra. Maria Olímpia Rezende
(USP)



Prof. Dr. Aldo Brugnera Jr. (Unicastelo)



Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)



Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli (UNESP)

Aos meus pais, Heitor e Neide, pela minha educação; algo que me torna uma pessoa forte para a luta diária e melhor para compreender a vida.

A Maria Eneida, minha mulher, pelo incentivo e compreensão da minha dedicação na vida acadêmica e profissional tornando possível que eu pudesse obter meu título de Doutor.

Ao meu filho, Lorenzo, pelos momentos de felicidade e convivência, que me estimulam na luta para superar as dificuldades diárias.

Meu eterno agradecimento a eles.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha criação e formação, que permitiu a graça e a capacidade de poder evoluir como pessoa e profissionalmente.

Aos meus pais, meu filho Lorenzo, minha enteada Bruna, familiares e, em especial, a minha mulher, pelas palavras de incentivo, carinho, que me proporcionam alicerce firme para construir e desenvolver meu trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente – entre eles: professores, doutorandos, professores convidados, alunos, secretarias, funcionários –, colaboraram com a realização deste trabalho.

Meu agradecimento ao Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato, por ter acreditado na minha capacidade e ter aberto as portas da Universidade de São Paulo (USP) e de seu laboratório, para que eu pudesse aprimorar meus conhecimentos científicos e evoluir também profissionalmente. Sua postura sempre atenciosa com minhas perguntas e meus anseios sempre me motivaram a seguir adiante em meus estudos.

A Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza, pela transmissão de conhecimentos sobre cultivo microbiológico em seu laboratório do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, que possibilitaram a realização dos meus experimentos com terapia fotodinâmica. E também pelos seus ensinamentos e orientação em microbiologia, contribuindo significativamente para a completa realização deste trabalho.

Aos companheiros do laboratório de Biofotônica do IFSC que me ajudaram direta e indiretamente em meu trabalho. Tenho que agradecer muito a vocês: Prof^a Cristina, Natália, Lili, Sebastião, Dirceu, Clóvis, Thaila, Mariana, Bruno Pereira, Patrícia, Ila, Dyleis, Ana Paula, Hilde, Gustavo, Carol, Mirian, Cintia, Ramon, Marcelinho, Fernanda Carbinato, Larissa, Toninho, Marcela, Marciana, Alessandra, Hérica e Ana Elisa.

A Posdoc Dr^a Priscila Menezes e ao pessoal do LAT que forneceu apoio em eletrônica para os aparelhos usados em minha pesquisa e, portanto, me auxiliaram na realização deste trabalho e na obtenção da patente do aparelho de LED intra-bucal. Obrigado, a toda a equipe!

Ao amigo e cirurgião-dentista Doutor Fernando L. E. Florez, sempre atencioso para me auxiliar na escrita dos artigos, o que me auxiliou na obtenção do título de Doutor.

Ao Doutor Clóvis Grecco, que me ajudou a fazer os gráficos e as tabelas deste estudo, facilitando a interpretação dos resultados obtidos.

A Doutora Fernanda Paolillo pela amizade e ajuda em realizar os gráficos e a análise estatística deste trabalho.

Ao pessoal da secretaria do Grupo de Óptica, por estarem sempre dispostos a ajudar. Muito obrigado, Isabel, Bene, Adriane e Cristiane!

A secretária da PPGBIOTEC UFSCar, Claudia Pastega, meus agradecimentos pela atenção dada durante todo o meu doutoramento.

Ao bibliotecário Lucas Pessota, por ter formatado e corrigido este texto, permitindo melhor entendimento para os que lerem este trabalho.

Aos colegas de turma, pela convivência agradável e pelos conhecimentos e experiências compartilhadas.

Ao projeto Finep/GNATUS e ao CNPq pelo apoio financeiro para desenvolver meu experimento o que permitiu que eu pudesse desenvolver minha pesquisa em desinfecção bucal.

"A melhor coisa que você pode fazer para cultivar a verdadeira sabedoria é praticar a consciência de que o mundo é um sonho."

Paramahansa Yogananda

RESUMO

Desmineralizações e cáries dentais estão comumente presentes em indivíduos portadores de aparelho fixo ortodôntico, isto ocorre devido ao aumento de acúmulo de biofilme dental contendo *Streptococcus mutans*, os quais produzem ácidos que atacam a superfície dental. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) tem sido mostrada como alternativa em inativação microbiana na Odontologia. Este trabalho, realizado *in vitro e in vivo*, tem o objetivo de avaliar o efeito antimicrobiano da TFDA sobre *Streptococcus mutans* em biofilme dental sobre superfície metálica de acessórios ortodônticos e em indivíduos sob tratamento ortodôntico. O estudo *in vitro* avaliou a susceptibilidade de biofilme formado por *S. mutans* sobre superfície metálica de acessórios ortodônticos sob aplicação de TFDA induzida por Curcumina diluída em surfactante (SDS) e por diodo emissor de luz azul (LED). Nas amostras obtidas de lâminas de bandas ortodônticas foram formados biofilmes e tratadas com fotossensibilizador (FS) com concentração de 1g/L, surfactante a 0,1% e exposto a luz LED (455±10 nm, 46mW/cm²), com fluência de 30J/cm². Os grupos experimentais estudados foram: C- (somente lavagem com solução fisiológica); L+ (aplicação apenas de luz); S+L- (aplicação de surfactante); S+L+ (aplicação de surfactante e luz); F+L- (aplicação de fotossensibilizador sem luz); F+L+ (aplicação de fotossensibilizador e luz); F+L-S+ (aplicação de fotossensibilizador sem luz + surfactante) e F+L+S+ (aplicação de fotossensibilizador e luz + surfactante). As colônias cultivadas em placas com *Brain Heart Infusion (BHI)* foram contadas (UFC/mL) e os resultados foram analisados por ANOVA e teste Tukey post hoc (p<0.05). Os resultados obtidos demonstraram que no protocolo deste estudo o grupo F+S+L+ foi capaz de promover diminuição significativa (p<0,001) da população de *S. mutans* em 99,999% comparado ao grupo controle. No estudo *in vivo*, 24 voluntários foram selecionados aleatoriamente, com o objetivo de avaliar a eficiência clínica da TFDA e da associação da TFDA com o surfactante SDS como agentes de descontaminação bucal em indivíduos ortodônticos. Os indivíduos selecionados foram distribuídos aleatoriamente em sete grupos experimentais: G1 - controle negativo, G2 - bochechos com curcumina, G3 - bochechos com curcumina + SDS, G4 - irradiação com luz apenas, G5 - TFDA, G6 - TFDA + SDS e G7 - Controle Positivo (clorexidina 0,12%). Amostras de saliva foram coletadas de maneira não estimulada de cada um dos indivíduos em três etapas (s), como segue: S1 - Condição inicial, S2 - Tratamento com bochechos (água, clorexidina ou curcumina) e S3 - Após TFDA. O fotossensibilizador usado foi a Curcumina em concentração de 1g/L. Foi utilizado no estudo dois tipos de equipamentos de luz com LED azul (450 ± 10nm,

33.54 mW/cm² e 212 mW/cm²). A avaliação da redução microbiana, e da fração de sobrevivência em cada um dos níveis estudados, foi realizada utilizando-se o teste ANOVA Kruskal-Wallis. A análise estatística mostrou que apenas os grupos 6 e 7 apresentaram resultados de inativação bacteriana que apresentavam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação aos resultados observados no grupo 1. Estes resultados indicam que a TFDA associada com o surfactante SDS pode ser utilizado como agente auxiliar conveniente para promover a descontaminação bucal.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Biofilme dental. Streptococcus mutans. Curcumina. Surfactante. Ortodôntico.

ABSTRACT

Demineralization and caries are often present in patients with orthodontic braces due to the increased accumulation of dental biofilm containing *Streptococcus mutans*, which produces acids that attack the tooth surface. The Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) has been shown as an alternative in microbial inactivation in dentistry. This work, carried out both *in vitro* and *in vivo*, aims to evaluate the antimicrobial effect of APDT on *Streptococcus mutans* present in the dental biofilm accumulated on the metal surface of orthodontic appliances and in patients undergoing orthodontic treatment. The *in vitro* study evaluated the susceptibility of biofilm formed by *S. mutans* on the metal surface under the application of orthodontic appliances APDT induced Curcumin diluted surfactant (SDS) and blue light-emitting diode (LED). The samples were treated with the photosensitizer (PS) at a concentration of 1 g/L, 0.1% surfactant and exposed to LED light (455 ± 10 nm, $46\text{mW}/\text{cm}^2$), fluence of $30\text{ J}/\text{cm}^2$. The experimental groups studied were: control group (P-L-S-); light (P-L+S-), surfactant (P-L-S+) and photosensitizer (P+L-S-) groups; surfactant-light (P-L+S+), photosensitizer-surfactant (P+L-S+) and PDT (P+L+S-) groups; and the PDT-surfactant (P+L+S+) group. Each group was named accordingly to the addition or not of the photosensitizer (P+ or P-), surfactant (S+ or S-) and application or not of light (L+ or L-), respectively. The colonies grown on plates of *brain heart infusion* (BHI) were counted (CFU / mL) and the results were analyzed by ANOVA and the post hoc Tukey test ($p < 0.05$). The results showed that in this research protocol, the group P+L+S+ was able to promote significant decrease ($p < 0.001$) on the population of *S. mutans* of 99.999% compared to the control group. In the *in vivo* study, 24 volunteers were randomly selected in order to evaluate the clinical utility of APDT and the APDT association with the surfactant (SDS) as oral decontamination agents in orthodontic patients. The selected patients ($n = 24$) were randomly divided into seven groups: G1 - Negative control, G2 - Curcumin mouthwash, G3 - Curcumin mouthwash+SDS, G4 - light irradiation, G5 - APDT, G6 - APDT+SDS and G7 - Positive Control (chlorhexidine 0.12% mouthwash). Saliva samples were collected from unstimulated way of each patient in three steps (S) as follows: S1 - initial condition S2 - Treatment with rinsing (water, curcumin or chlorhexidine) and S3 - After APDT. The photosensitizer used was curcumin with concentration of 1 g/L. Two types of blue LED light source emitting in $450 \pm 10\text{nm}$ were used in the present study: one emitting with an intensity of $33.54\text{ mW}/\text{cm}^2$ and other with $212\text{ mW}/\text{cm}^2$. Evaluation of microbial reduction, and survival

fraction in each of the studied levels, was performed using the Kruskal-Wallis ANOVA test. Statistical analysis showed that only G6 and G7 presented results of bacterial inactivation that showed statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to those observed in G1. These results indicated that APDT, when combined with SDS surfactant, may be used as an adjunct agent for convenient oral decontamination promoter *in vivo*.

Keywords: Photodynamic therapy. Light-induced damage. Oral biofilm. Streptococcus mutans. Curcumin. Surfactant. Orthodontic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da formação de um biofilme dental	21
Figura 2 - Esquema representativo da reação de oxi-redução de células tumorais e micro-organismo promovida pela TFD	22
Figura 3 - Estrutura química da Curcumina	24
Figura 4 - Diagrama de Jablonski adaptado mostrando transferência de energia para produção de oxigênio molecular reativo	25
Figura 5 - Gráfico mostrando o espectro de absorbância da Curcumina	26
Figura 6 - Gráfico adaptado mostrando comprimentos de ondas da luz	27
Figura 7 - Imagem da difusora de luz azul com 5 leds emitindo em 450nm de comprimento de onda.....	29
Figura 8 - Imagem do Bright Max Evolution – MMOptics com LED azul de 450nm de comprimento de onda	29
Figura 9 - Estrutura molecular do surfactante	31
Figura 10 - Estrutura química da clorexidina (1,6-di(4-clorofenildiguanida)hexano	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição energética e eletrônica nos orbitais do oxigênio no estado singleto e tripleto.....	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI - Brain Heart Infusion
CTAC - Cloreto de Cetiltrimetilamônio
EGM - Estreptococcus do Grupo Mutans
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
DMSO - Sulfóxido de Dimetilo
FS - Fotossensibilizador
GTFS - Amilase e Enzimas Glucosiltransferase
HpD - Hematoporfirina
HPS - N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato
IFSP - Instituto de Física de São Carlos
LED - Diodo Emissor de Luz
MB - Azul de Metileno
PDT - Photodynamic Therapy
PEC - Polissacarídeos Extra-celulares Insolúveis
PIC - Polissacarídeos Intra-celulares
TFD - Terapia Fotodinâmica
TFDA - Terapia Fotodinâmica Antimicrobial
USP - Universidade de São Paulo
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 Streptococcus mutans.....	20
3 TERAPIA FOTODINÂMICA	22
3.1 Curcumina.....	23
3.2 Luz	26
4 SURFACTANTE	30
5 CLOREXIDINA	32
6 OBJETIVO	34
7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
8 ARTIGO EXPERIMENTO IN VITRO	36
9 ARTIGO EXPERIMENTO IN VIVO.....	53
10 DISCUSSÃO	68
11 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE A	82
APÊNDICE B.....	90
APÊNDICE C	94

1 INTRODUÇÃO

O *Streptococcus mutans* é o agente etiológico responsável pela descalcificação dental, formação da cárie e desenvolvimento de doenças periodontais nos seres humanos. Por esse motivo tem sido estudado a sua inativação em odontologia por vários pesquisadores^{1,2}. Os métodos tradicionais mais utilizados para descontaminação bucal são limpeza dental profilática feita com instrumental profissional em odontologia, escovação dental, uso de fio dental e bochechos com solução antimicrobiana. Dentre estes métodos, a escovação dental é o método mais utilizado para a higiene bucal e reconhecida na literatura como terapia para o controle do biofilme dental³. O biofilme dental é uma comunidade multi-espécies de micro-organismos em uma matriz de polissacarídeos que se adere a superfície dental, essa estrutura do biofilme confere uma característica protetora aos *S mutans* da ação de antimicrobianos. Os agentes antimicrobianos para bochechos são utilizados como procedimentos complementares a escovação mecânica para maior controle da higiene bucal dos indivíduos. No entanto, essas soluções antimicrobianas que apresentam efeito na descontaminação bucal apresentam substâncias ativas que provocam efeitos colaterais e devido ao seu mecanismo de ação podem gerar cepas microbianas resistentes⁴.

A terapia fotodinâmica (TFD) é um conhecido tratamento oxidativo utilizado para o tratamento oncológico e também pode ser usado em terapia antimicrobiana. A utilização da TFD com ação antimicrobiana surgiu em 1900, quando o médico alemão Oscar Raab combinou a aplicação de luz solar e corantes como a acridina para inativar micro-organismos unicelulares – *Paramecium caudatum*⁵. A TFD antimicrobial (TFDA) consiste em aplicar uma droga conhecida como fotossensibilizador (FS) e luz sobre um micro-organismo que na presença de oxigênio orgânico produz espécies reativas de oxigênio (ERO) e por reação de oxi-redução provocam danos aos componentes estruturais do micro-organismo levando a sua inativação.

Existem vários tipos de FSs utilizados em TFD que podem ser excitados por comprimentos de ondas eletromagnéticos específicos. Os FSs podem ser sintéticos e naturais. Os FSs naturais mais estudados são os compostos derivados da hematoporfirina (HpD) encontrados no sangue. Essas porfirinas constituem o primeiro grupo de substâncias estudadas para aplicação da TFD e por isso são chamadas de FSs de primeira geração. Entre esses HpD, são encontrados comercialmente o Photofrin® (americano), Photogem® (russo) e Photosan® (alemão) com características fotofísicas muito parecidas. A segunda geração de FSs é composta por

substâncias naturais como a hipericina, bacteroclorinas e clorinas, tal como a Photodithazine® (russa). Na odontologia os FSs mais usados como antimicrobianos são o azul de metileno e o azul de tolúidina, da família das fenotiazinas, que são de origem sintética. Outras substâncias sintéticas de segunda geração são as naftalocianinas e ftalocianinas. A Curcumina surgiu recentemente como um FS alternativo na TFDA, é de origem natural e foi escolhido para ser utilizado neste estudo, por ser de baixo custo e biodegradável na natureza. A Curcumina é um corante obtido a partir da raiz do açafrão-da-Índia (*Curcuma longa*) muito utilizado como aditivo alimentar e é excitada na TFDA com luz azul.

Várias fontes de luz podem ser utilizadas na TFDA; a literatura descreve o emprego de diferentes sistemas de LASER com intensidade de baixa potência, porém, novos estudos a partir do desenvolvimento dos diodos emissores de luz (LEDs) tem mostrado ser uma eficiente fonte de luz aplicada na TFDA^{6,8}. O LED como fonte de luz na TFDA quando comparados aos sistemas de LASERs disponíveis apresentam vantagens como irradiar maior área de tecido, ter menor consumo de energia e ainda possuem um tempo útil de vida maior^{7,8}. Por esses motivos, o uso do LED na TFDA tornou-se mais atraente, facilitando sua implementação em terapias fotônicas aplicada à saúde.

A preocupação com a estética facial tem origem pré-histórica relatado em estudos de Paleontologia⁹ e nesse assunto se insere o tratamento ortodôntico que diariamente inclui maior quantidade de indivíduos que buscam não apenas melhor função mastigatória, mas também harmonia facial através de correção dentária com o uso de aparatos ortodônticos. Os aparelhos ortodônticos são compostos de bandas, braquetes e outros dispositivos intra-bucais que alteram a microbiota bucal aumentando o acúmulo de *S. mutans*.^{10,11} Diante do maior acúmulo de microorganismos cariogênicos durante o tratamento ortodôntico terapias coadjuvantes no controle do biofilme dental tem sido estudadas para controle da microbiota bucal no sentido de se obter uma terapia que seja considerada a ideal.

A TFDA tem mostrado efeito de inativação sobre *S. mutans* em estudos principalmente na forma planctônica, porém quando encontramos o *S. mutans* presente em biofilme o mesmo fica protegido por matriz de polissacarídeos e apresenta maior resistência a ação de antimicrobianos.^{2,12} As principais hipóteses discutidas na literatura relatam que a TFDA não tem inibição satisfatória de *S. mutans* devido à incapacidade do FS em difundir-se em biofilme e atingir ou penetrar a membrana celular microbiana situada nas camadas mais profundas do biofilme.

Os surfactantes são moléculas anfifílicas que tem mostrado serem agentes ativos capazes de aumentar a permeabilidade da parede celular e agirem como desagregador do biofilme por sua atividade detergente. A TFDA utilizando azul de metileno (MB) combinado com surfactante foi utilizada para aumentar a permeabilidade em células de *C. albicans* diminuindo a formação de biofilme, sua habilidade de adesão e sua resistência às outras drogas.¹³ O surfactante pode ser considerado aditivo interessante para potencializar o efeito antimicrobiano na TFDA pois aumenta a solubilidade da Curcumina e promove alteração da membrana celular microbiana e, em sinergismo com os FS, aumenta o efeito antimicrobiano da TFDA, que pode promover melhor controle microbiológico do biofilme dental em indivíduos portadores de aparatos ortodônticos.^{14,16}

Este trabalho foi realizado com aplicação de TFDA em dois experimentos, um experimento *in vitro*, sobre biofilme dental formado sobre amostras metálicas de bandas ortodônticas; e outro experimento *in vivo*, em indivíduos portadores de aparelho ortodôntico fixo. O objetivo deste trabalho foi mostrar o efeito sinérgico de Curcumina solubilizada em surfactante (SDS) para potencializar a eficácia antimicrobiana da TFDA em *S. mutans* presentes na superfície metálica de acessórios ortodônticos empregados no meio bucal para correção dental.

2 Streptococcus mutans

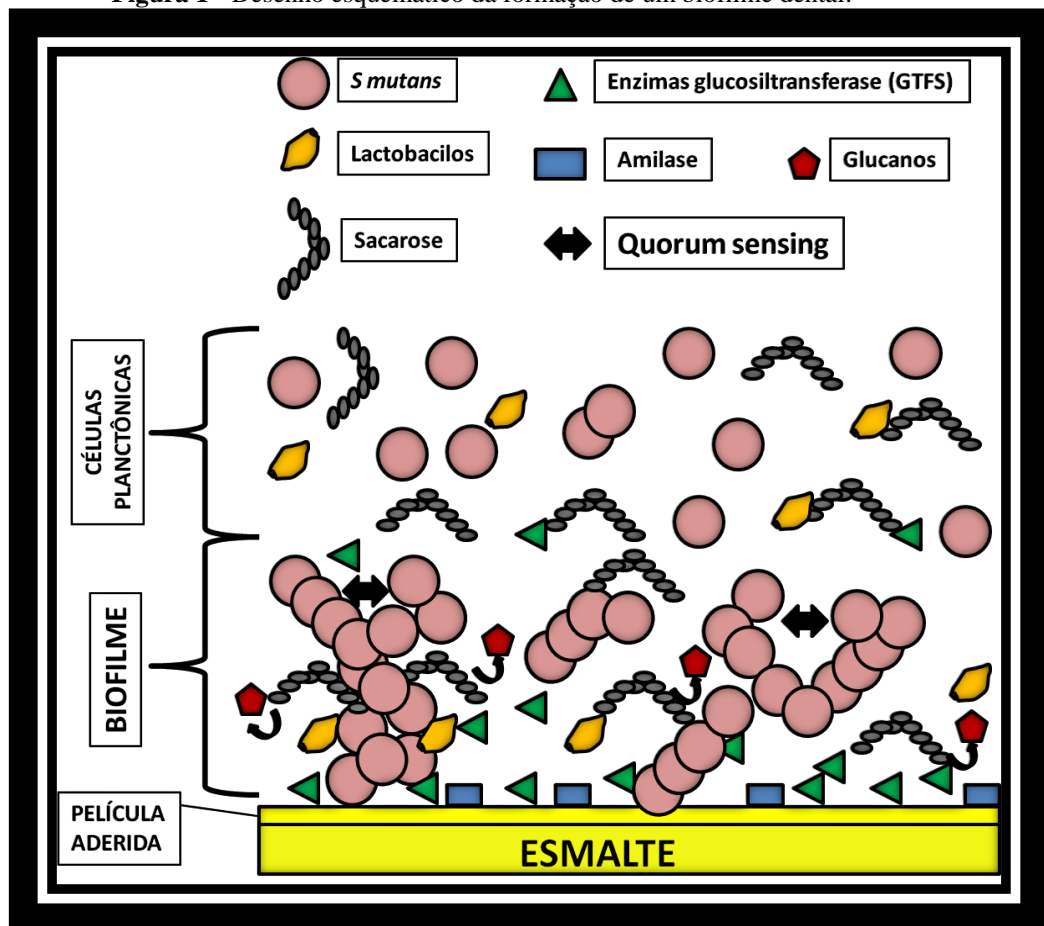
Os Estreptococcus do Grupo mutans (EGM) são micro-organismos frequentes nos dentes e cavidade bucal. Pertencem a este grupo de Estreptococcus: *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. ferus*, *S. macacae* e *S. downei*. Os EGM fazem parte também da flora da faringe, sistema gastro-intestinal, vias áreas superiores e sistema urinário. Os *S mutans* são anaeróbios facultativos que se coram com Gram e apresentam morfologia de cocos. Os *S mutans* além de adesividade a superfície dental podem também atingir no sistema circulatório e por via endovenosa atingir às válvulas cardíacas podendo causar endocardite sub-aguda. O *S sobrinus* está envolvido no processo inicial de adesão e formação do biofilme dental contribuindo para a proliferação do *S mutans* e dando início ao processo de cárie dental.¹⁷ Os biofilmes dentais ou também chamadas placas dentais são comunidades de micro-organismos aglomerados e contidos em uma matriz autoproduzida que se adere a diferentes superfícies, assim como o dente, acessórios metálicos ortodônticos e implantes dentais metálicos.

O *S mutans* é um micro-organismo acidófilo e acidogênico, ou seja, capaz de metabolizar açúcares e produzir ácidos sendo resistente aos mesmos. Uma de suas principais características é não crescer em caldo contendo altas concentrações de sal. Devido as suas características acidogênicas são responsáveis por seu potencial em produzir desmineralizações do esmalte e cárie dental. A produção de ácidos para o desenvolvimento da cárie não ocorre apenas por *S mutans*, outros micro-organismos acidogênicos como os lactobacilos também estão envolvidos neste processo.¹⁸ Os *S mutans* a partir de açúcares (sacarose, glicose, frutose e maltose) encontrados no meio bucal são capazes de produzir por ação enzimática (amilase e enzimas glucosiltransferase - GTFS), glucanos (polissacarídeos extra-celulares insolúveis - PECs), que são responsáveis por formar a estrutura e dar adesão do biofilme dental. (Figura 01) Os PECs produzidos pelos *S mutans*, além da adesão do biofilme apresenta outra função fisiológica de formarem uma matriz extra-celular porosa contendo pequenos canais que permitem que os ácidos produzidos pelos *S mutans* se difundam em direção a superfície dental levando a desmineralização dental. Para se ligar aos glucanos os *S mutans* usam proteínas de superfícies chamadas proteínas ligantes de glucano, que podem se ligar de maneira covalente e não covalente a parede celular microbiana.

Devido ao formato estrutural dos biofilmes dentais, suas camadas mais profundas de micro-organismos ficam protegidas da ação de antimicrobianos. Porém, os canais formados na

matriz de polissacarídeos proporcionam permeabilidade ao biofilme permitindo que penetrem nutrientes, metabólitos, oxigênio e drogas com atividades antimicrobianas. Outro fator de proteção e sobrevivência que os micro-organismos em biofilme apresentam é o *quorum sensing*, que é a capacidade que estas células apresentam em se comunicar de maneira coordenada enviando sinais para a expressão gênica de fatores de virulência, adaptação à escassez de nutrientes e de defesa a substâncias tóxicas.¹⁹ (Figura 01) Os *S mutans* também produzem polissacarídeos intra-celulares (PICs) a partir de carboidratos encontrados no meio bucal que servem de reserva de nutrientes para serem metabolizados quando as fontes de açúcares estão ausentes.

Figura 1 - Desenho esquemático da formação de um biofilme dental.

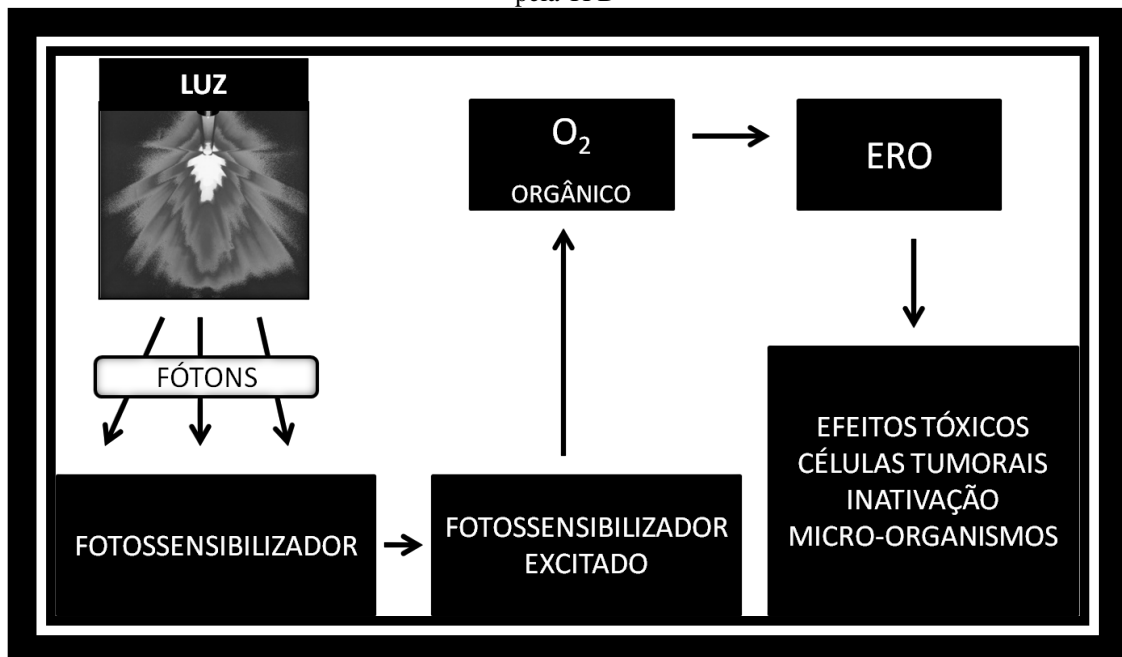


Fonte: elaborado pelo autor (Panhóca, 2015).

3 TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia fotodinâmica (TFD) foi introduzida na terapia médica hodierna em 1904, por Oscar Raab, na inativação de células, microrganismos e moléculas. Essa modalidade de tratamento denominada de TFD tem sua origem no termo em inglês *Photodynamic Therapy* (PDT).²⁰ Essa técnica tem como base a utilização combinada de luz visível com comprimento de onda específico, com certos tipos de drogas que são denominadas de fotossensibilizadores (FS), que, quando utilizados em conjunto e na presença de oxigênio, produzem uma reação de oxidação das células cancerígenas que provocará a lise das células-alvo e, por consequência, a indução de morte da célula tumoral. A TFD tem sido mostrada em vários estudos como uma terapia viável e alternativa com potente efeito antimicrobiano.^{1,6,7} Na TFD a reação de oxirredução de células tumorais e micro-organismos ocorre por fotoativação dos FSs que se transformam em um estado eletrônico super-excitado gerando energia que reage com o oxigênio orgânico livre produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO). Esses radicais livres não possuem especificidade por sítio de ação, reagindo com vários substratos biomoleculares das células vivas levando as células tumorais a apoptose e inativação microbiana. Figura 02.

Figura 2 - Esquema representativo da reação de oxirredução de células tumorais e micro-organismo promovida pela TFD



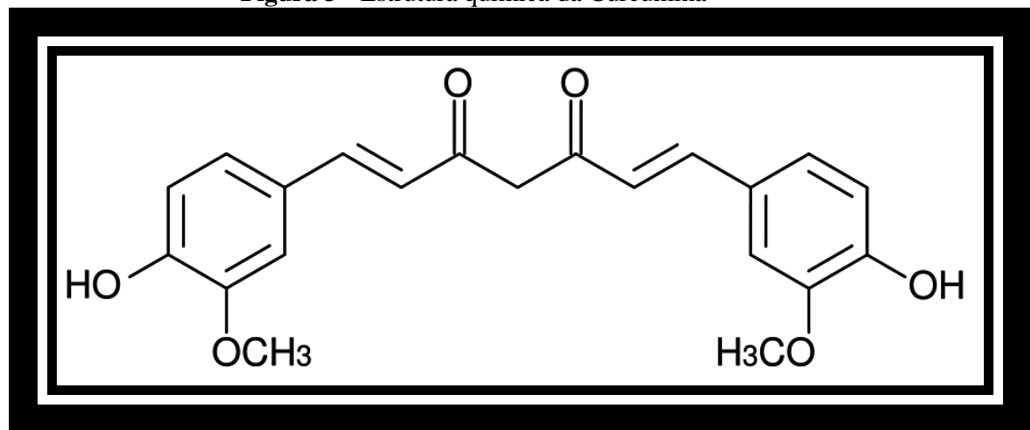
Fonte: elaborado pelo autor (Panhóca, 2015).

A inativação de microrganismos pela TFDA pode apresentar diversas vantagens em relação à utilização de agentes antimicrobianos tradicionais. Primeiramente, a morte bacteriana é rápida, diminuindo a necessidade da manutenção de altas concentrações de substâncias químicas por longos períodos, como no caso do uso de antibióticos e anti-sépticos²¹ e, em segundo lugar, como a morte bacteriana não está ligada à mediação de radicais químicos agindo sobre alvos específicos, o desenvolvimento de cepas resistentes seria improvável.^{22,23} Finalmente, como nem o fotossensibilizador, nem a luz de baixa intensidade empregada são bactericidas quando utilizados isoladamente, a destruição das bactérias pode ser controlada restringindo-se a região irradiada, evitando a destruição da microbiota normal em outros locais.

O efeito da TFDA como um antimicrobiano é influenciado não apenas pelo tipo de micro-organismo tratado, mas também por outros fatores como o tipo de FS, a concentração do FS, a sua localização durante a irradiação, o período de pré-incubação do FS, o tipo de fonte de luz utilizado, a dosimetria de luz aplicada e a concentração de oxigênio orgânico livre presente no local a ser tratado.

3.1 Curcumina

A Curcumina é uma das diversas substâncias utilizadas como FS na TFDA. É um corante de origem vegetal obtido da raiz da *Cucuma Longa* com um baixo custo econômico. A Curcumina é muito utilizada na tradicional culinária Indiana. Vários estudos mostram seu efeito antimicrobiano que é potencializado quando se aplica luz azul concomitantemente.^{24,28} A Curcumina (diferuloilmetano) é um polifenol com baixo peso molecular (Figura 03), primeiramente caracterizado no ano de 1910. Este polifenol tem sido objeto de várias pesquisas para diversas aplicações em saúde com a intenção de se estudar seu efeito como potente anti-inflamatório, antioxidante, antitumoral, neuroprotetor e antimicrobiano. A Curcumina é encontrada comercialmente em forma de sal com coloração amarelada e para seu uso experimental necessita de diluição em solvente (DMSO).

Figura 3 - Estrutura química da Curcumina

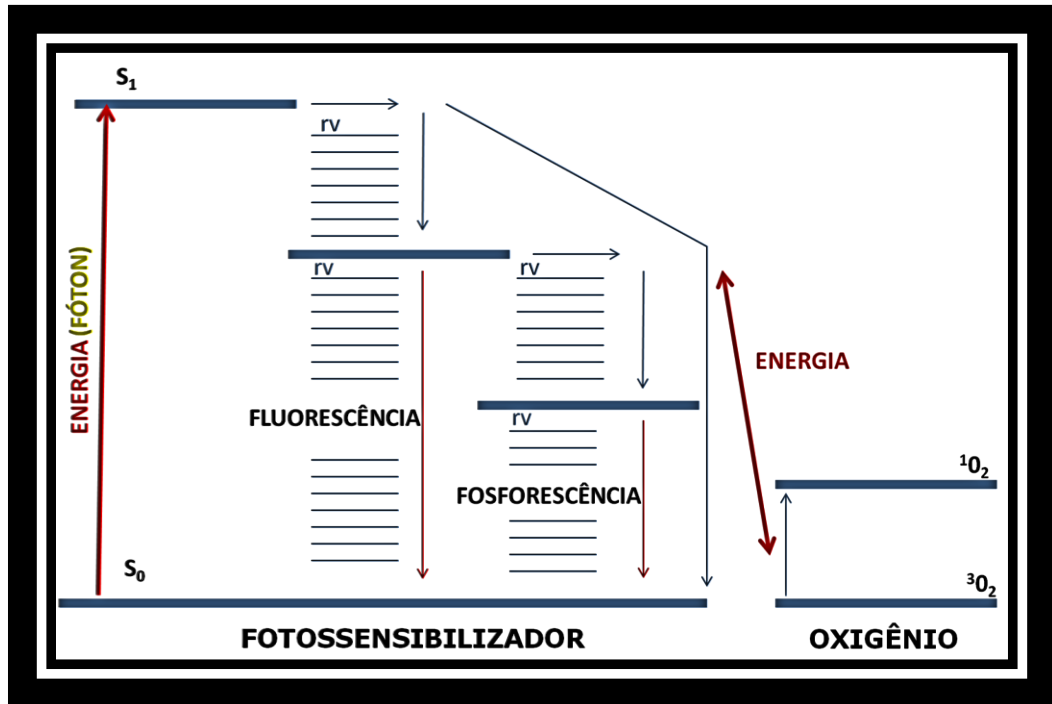
Fonte: disponível em < <http://www.drivictorsorrentino.com.br/o-poder-da-curcumina-na-prevencao-e-tratamento-de-doencas/> >.

Na TFDA, no mecanismo de fotoativação são importantes as características fotofísicas do FS empregado para que ocorra alto rendimento quântico por parte do FS. O rendimento quântico é a quantidade de moléculas de FS que absorvem fótons e produzem energia, o qual é dependente do oxigênio molecular disponível no local irradiado para que ocorra uma eficaz TFDA. O ideal é que um FS além de alto rendimento quântico com o comprimento de onda específico utilizado, ele apresente outras características, como: alta produção de oxigênio singlete; eliminação rápida pelas células que não devem ser atacadas; não serem tóxicas no escuro; fácil diluição em água; alta estabilidade física cinética e termodinâmica; síntese fácil, rápida e barata; curto período de pré-incubação para absorção pelas células-alvo e não provocarem mutação nos tecidos tratados.

No mecanismo de ação antimicrobiano da TFDA é necessário que o comprimento de onda da luz aplicada seja ressonante com a capacidade de absorvência do FS para que o mesmo possa ser excitado a partir do seu estado fundamental. O FS em seu estado fundamental é o estado singlete (S_0) que ao absorver energia entregue por luz (fóton) transforma o FS em um estado eletrônico excitado de maior energia (S_1) com característica de decaimento rápido para seu estado fundamental e por isso apresenta um tempo de vida curto. O decaimento ou relaxamento vibracional (rv) do FS (S_1) pode acontecer de maneira mais lenta em um estado eletrônico intermediário, entre o fundamental e o excitado, emitindo fluorescência e fosforescência (Figura 04). O FS no estado S_1 quando decai para o estado S_0 produz fóton capaz de transferir energia para os constituintes circunvizinhos, tal como o oxigênio molecular e produzir EROs capazes de oxidar os micro-organismos.²⁷ Entre as EROs geradas na TFDA, o

oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) apresenta maior efeito oxidante que o próprio oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) e por este motivo tem ação tóxica capaz de inativar os micro-organismos (Figura 04).

Figura 4 - Diagrama de Jablonski adaptado mostrando transferência de energia para produção de oxigênio molecular reativo



Fonte: elaborado pelo autor (Panhóca, 2015).

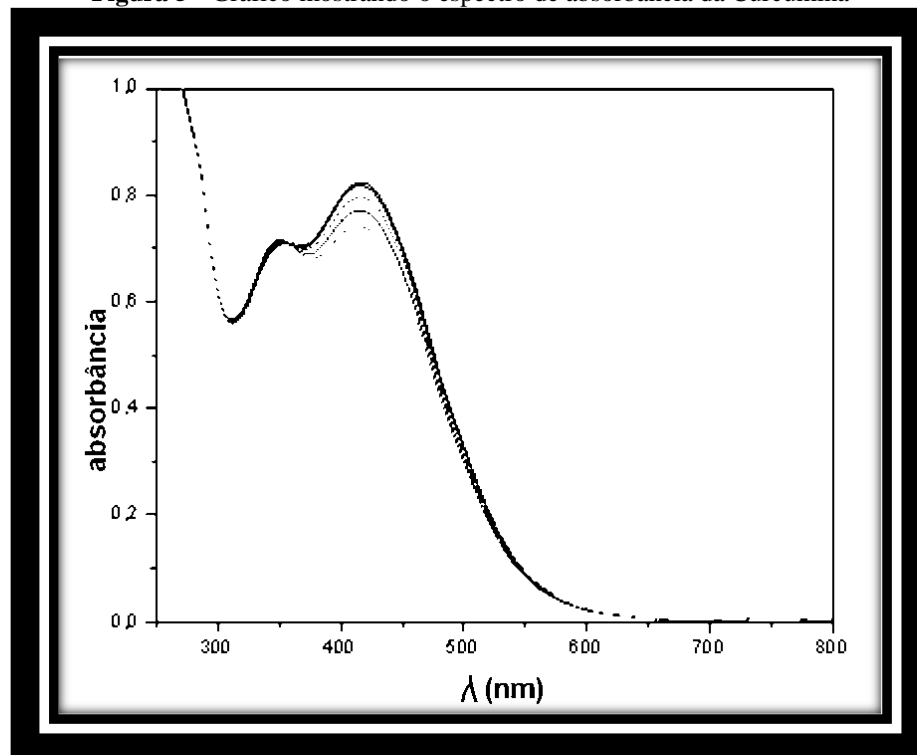
O oxigênio singlete pode se apresentar em dois estados: $^1\text{O}_2$ seria o estado excitado que tem dois elétrons com spin opostos no mesmo orbital, energia de 22,5 Kcal acima do estado fundamental e tempo de meia vida curto em solvente aquoso de 10^{-6} s; e $^1\text{O}_2^+$ seria um estado excitado onde tem um elétron em cada orbital com spin opostos e energia de 37,5 Kcal acima do estado fundamental e tempo de meia vida muito curto em solvente aquoso de 10^{-11} s. Esse segundo estado do oxigênio singlete por decair muito rápido não apresenta interesse em reações biológicas (Tabela 01). O oxigênio singlete em seu estado excitado pode sofrer decaimento para seu estado fundamental e emitir luz ou pode transferir sua energia para outras moléculas de um substrato orgânico provocando oxidação e dano ao mesmo.

Tabela 1 - Distribuição energética e eletrônica nos orbitais do oxigênio no estado singlete e tripleto

ESTADO	ENERGIA	ORBITAIS	TEMPO DE MEIA VIDA
$^1\text{O}_2^+$	37,5 Kcal	↑ ↓	10^{-11} s
$^1\text{O}_2$	22,5 Kcal	↑↓	10^{-6} s
$^3\text{O}_2$		↑ ↑	

Fonte: adaptado de Martinez, Medeiros e Di Mascio.⁶³

A Curcumina apresenta espectro máximo de absorção da luz na região do violeta e azul (300-500nm)²⁴ (Figura 05). Na presente pesquisa, a solução de Curcumina utilizada para a TFD dos grupos experimentais analisados foi formulada com sais de Curcumina produzidos pela indústria PDT Pharma, Cravinhos, SP, Brasil.

Figura 5 - Gráfico mostrando o espectro de absorbância da Curcumina

Fonte: adaptado de Alzate Ceballos et al.⁶¹

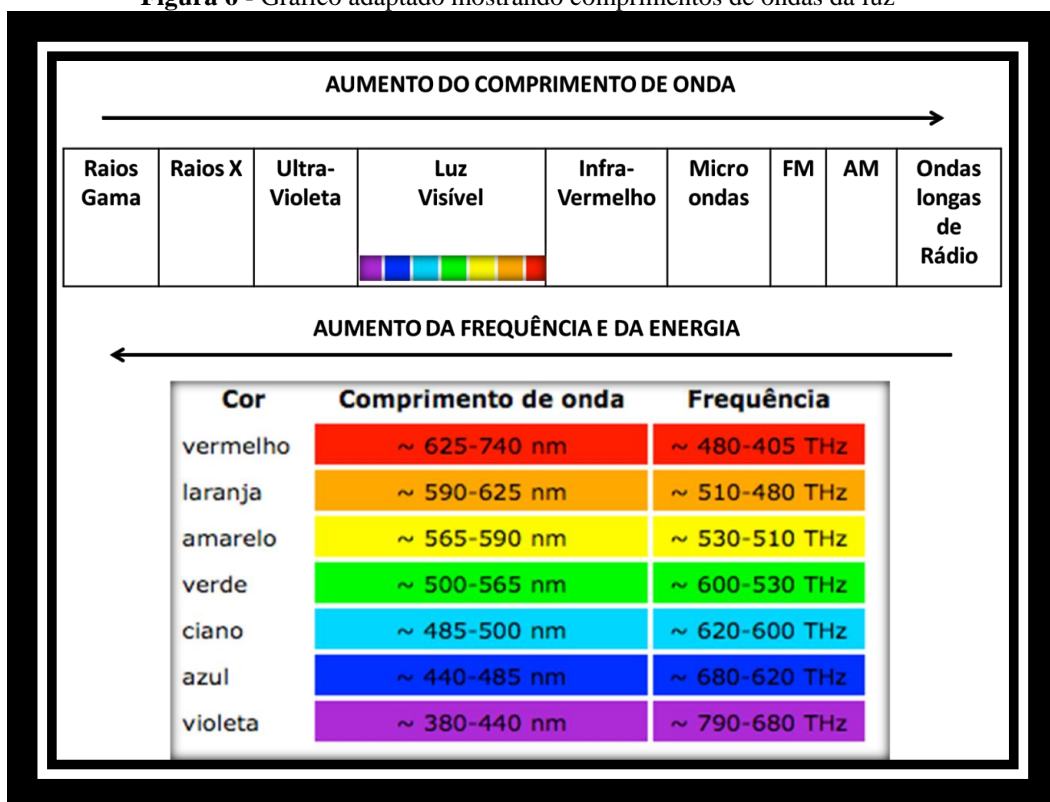
3.2 Luz

A escolha da cor, fonte e dosimetria de luz utilizada na TFDA faz parte da estratégia de irradiação das superfícies dos tecidos a serem tratados para se obter penetração de luz suficiente, de tal forma que os fótons consigam entregar energia para gerar rendimento quântico capaz de

excitar FSs e na sequência produzir oxigênio citotóxico e obter uma taxa de redução microbiana eficiente nesta terapia.

A luz azul apresenta comprimento de onda por volta de 440 a 485nm que é menor em relação ao vermelho com comprimento de onda por volta de 625 a 740nm(Figura 06). Considerando essa diferença de comprimentos de ondas, pode-se dizer que ocorre menor penetração da luz azul nos tecidos do que a luz vermelha. No entanto, a luz azul produz fótons, pacotes de energia, com maior frequência e carga energética capaz de promover de maneira mais eficaz a excitação eletrônica da Curcumina para inativação microbiana fotodinâmica. Embora a luz azul seja mais interessante no mecanismo fotodinâmico quando se usa Curcumina como FS e se deseja entregar maior quantidade de energia em uma superfície, cuidado deve ser tomado quando se irradia com luz azul os tecidos vivos, por ser mais absorvida superficialmente e apresentar maior energia acumulada nesta região pode ocorrer aumento de temperatura superficial levando a dano térmico destes tecidos em função da energia cinética gerada no local irradiado que altera a termodinâmica tecidual.

Figura 6 - Gráfico adaptado mostrando comprimentos de ondas da luz



Fonte: adaptado de Centro de Referência Virtual do Professor.⁶²

Na TFD é necessário que os FSs, moléculas fotoabsorvedoras, sejam fotoativadas com um comprimento de onda específico resultando em um estado superexcitado destas moléculas, tornando-as eficazes no mecanismo de oxidação e inativação microbiana. A fonte de luz mais utilizada em TFD tem sido o LASER de baixa potência, porém atualmente vários trabalhos mostram a mesma eficácia quando se usa o LED como fonte de luz^{8,29}. Os aparelhos com fonte de luz LED apresentam como principais diferenças do LASER de baixa potência, a falta de coerência entre as ondas eletromagnéticas e não terem uma banda estreita monocromática de luz. Estas características não alteram a capacidade do LED em produzir EROs que vão oxidar e inativar os micro-organismos. Os fótons gerados pelos aparelhos de LASER de baixa potência ou LED, independente da coerência das ondas eletromagnéticas, quando entram em contato com moléculas FSs são capazes de excitá-las e por transferência de energia para o oxigênio orgânico produzir substâncias tóxicas (EROs) responsáveis pelo mecanismo de oxi-redução microbiano. Os aparelhos feitos com LED apresentam vantagens em relação ao LASER por apresentarem maior área de irradiação, consumirem menor energia, ter maior durabilidade e menor custo de produção.³⁰

Neste estudo foi utilizado para o experimento *in vitro* sistema de irradiação, denominado Biotable, desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico – IFSC - USP, São Carlos, Brasil. A Biotable contém 24 LEDs dispostos de maneira a irradiar de forma homogênea as placas acrílicas com 24 poços contendo as amostras experimentais. A Biotable apresenta potência de 46mW/cm² e produz luz na cor azul com comprimento de onda igual a 450 ±10 nm, ressonante com a coloração amarela da Curcumina.

No experimento *in vivo*, a TFD foi realizada com equipamento de LED com ponta difusora de luz (pedido de patente RUSP nº 2014.1.242.76.0) com 5 LEDs (Figura 07) para iluminar toda a cavidade bucal (incluindo dentes, bochecha e língua) desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico – IFSC - USP, São Carlos, Brasil (ver Apêndice A) emitindo luz azul com comprimento de 450 nm (±10nm) e um equipamento multi-led azul com 5 LEDs - Bright Max Evolution – MMOptocs (Figura 08) (ver Apêndice B) para iluminar a superfície dental vestibular das arcadas superiores e inferiores emitindo luz azul com comprimento de onda em 450 nm (±10nm). Os aparelhos com fonte de luz LED utilizados neste experimento foram cobertos com filme plástico descartável criando uma barreira física entre o paciente e o aparelho com intenção de controlar infecção cruzada e como medida de higiene. Paciente e

operador dos aparelhos de luz para descontaminação bucal utilizaram óculos de proteção ocular evitando danos que os comprimentos de ondas nesta terapia possam causar aos olhos.

Figura 7 - Imagem da difusora de luz azul com 5 leds emitindo em 450nm de comprimento de onda.



Fonte: elaborado pelo autor (Panhóca, 2015).

Figura 8 - Imagem do Bright Max Evolution – MMOptics com LED azul de 450nm de comprimento de onda.

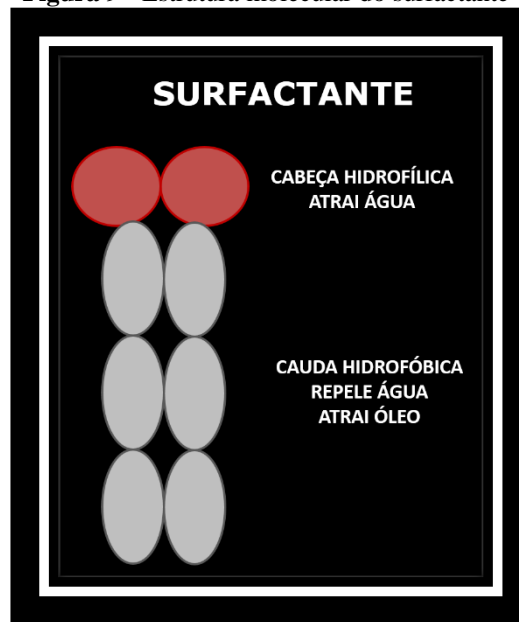


Fonte: elaborado pelo autor (Panhóca, 2015).

4 SURFACTANTE

Surfactantes são agentes ativos de superfície. Os surfactantes são muito utilizados na indústria alimentar com o objetivo de inibir a formação de biofilmes em superfícies de equipamentos industriais.³¹ Sua principal característica é a capacidade de ser absorvido em superfícies e áreas de interface entre diferentes materiais. Outra característica dos surfactantes é apresentar capacidade de redução de tensão superficial para fluídos aquosos, o que permite que tenham ação detergente, humidificante e emulsionante. Por este motivo são muito utilizados pela indústria para produtos de limpeza e cosmética. No preparo da solução para bochecho o surfactante aumenta a solubilização das moléculas de Curcumina diminuindo sua agregação e potencializando o seu efeito quântico antimicrobiano na TFDA.

Os surfactantes são moléculas anfifílicas que podem ser divididas em duas partes diferentes, a parte hidrofóbica (parte apolar) e a parte hidrofílica (parte polar). A parte hidrofílica (atrai a água) é referente ao grupo da cabeça e a parte hidrofóbica (repele a água) à cauda (Figura 09). Em baixa concentração, o surfactante se distribui de maneira uniforme, porém, em concentrações elevadas, o surfactante forma micelas. Os surfactantes por serem moléculas anfifílicas são agentes ativos capazes de aumentar a permeabilidade da parede celular, diminuir a adesividade microbiana e agirem como desagregador do biofilme. São utilizados na bioquímica e biotecnologia com diversas aplicações como, solubilização, purificação, determinação e caracterização de proteínas.

Figura 9 - Estrutura molecular do surfactante

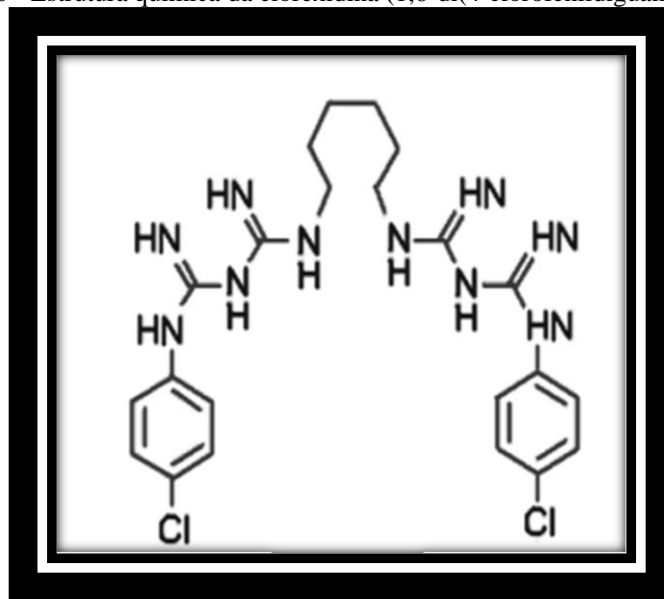
Fonte: elaborado pelo autor (Panhóca, 2015).

O surfactante pode ser considerado aditivo interessante para potencializar o efeito antimicrobiano na TFDA, pois promovem alteração da membrana celular microbiana tornando-a mais permeável, permitindo maior penetração de FS, aumentando o seu efeito antimicrobiano, o que pode promover melhor controle microbiológico do biofilme dental em indivíduos portadores de aparatos ortodônticos.^{14,16} Na literatura encontramos estudo mostrando a eficácia antimicrobial quando se aplica TFDA utilizando azul de metileno (MB) combinado com vários tipos de surfactantes, SDS (aniônico), CTAC (catiônico), HPS (zwiteriônicos) e Triton X-100 (não-ionico); os surfactantes na referida pesquisa foram utilizados para aumentar a permeabilidade em células de *C. albicans*, diminuir sua adesividade por superfícies, diminuir a formação de biofilme e diminuir sua resistência às outras drogas.¹⁴ Na presente pesquisa o surfactante utilizado foi o dodecil sulfato de sódio (SDS) que é o mais utilizado como detergente em pastas dentais de uso caseiro.

5 CLOREXIDINA

No controle do biofilme dental para prevenir doenças bucais crônicas, tais como: cárie, gengivite e periodontite; tem sido utilizado vários tipos de solução enxaguatória, porém a clorexidina a 0,12% é considerada a mais eficiente.³² A clorexidina foi sintetizada nos anos 40 e apresentava sua estrutura molecular como pode ser visto na figura 10. Após isso, Rose e Swain formularam a clorexidina em 1956 e foi comercializada como anti-séptico para ferimentos de pele.³³ Desde a década de 70, estudos tem mostrado o efeito de inibição completa do biofilme dental e prevenção de gengivite quando se aplica diariamente a clorexidina, desde que o agente seja administrado de tal forma que ele entre em contato com todas as superfícies dos dentes.³⁴ A clorexidina é um detergente catiônico, da classe das bisbiguanidas, disponíveis nas formas de acetato, hidrocloreto e digluconato, sendo esta última a forma mais comumente utilizada como antimicrobial em odontologia.

Figura 10 - Estrutura química da clorexidina (1,6-di(4-clorofenildiguanida)hexano)



Fonte: disponível em <
http://pt.wikipedia.org/wiki/Gluconato_de_clorexidina#mediaviewer/File:Chlorhexidine.png >.

Seu mecanismo de ação ocorre por rompimento da membrana celular microbiano, por ser uma molécula dicatiônica e interagir rapidamente com a superfície microbiana que é negativa promovendo mudanças citológicas que afetam sua permeabilidade e levando ao extravasamento de constituintes intra-celulares. Os grupamentos lipofílicos da clorexidina promovem desestruturação da camada lipoproteica microbiana dificultando sua função

protetora osmótica, a partir disto se inicia os eventos subsequentes diretamente dependente da concentração de clorexidina no meio celular. Em doses mais altas causa coagulação e precipitação das proteínas citoplasmáticas e a morte microbiana.³⁵ A clorexidina por ser uma molécula dicatiônica apresenta capacidade química de ligar a película dental adquirida e membrana bacteriana ao mesmo tempo. Isso resulta em uma substantividade, que é a capacidade de se manter ativa no meio bucal, durante aproximadamente 8 a 12 horas, inativando os micro-organismos que buscam colonizar a superfície dental. Outro fator que influencia a substantividade da clorexidina é o pH bucal, que sendo ácido aumenta sua eficácia.³⁶

A clorexidina atualmente é considerada como padrão ouro em descontaminação bucal, usada com eficácia em periodontia para o controle de gengivites e periodontopatias.³⁷ Sua formulação mais utilizada é em solução para bochechos com concentração a 0,12% para uso diário com bochechos de 15 mL por 30 segundos em até três vezes ao dia. Não se recomenda seu uso de maneira continuada por apresentar efeitos indesejáveis que variam em cada indivíduo. Os efeitos colaterais mais conhecidos causados pela clorexidina são a alteração de cor do dente e do paladar do indivíduo.

6 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo analisar o efeito da TFDA sobre *S mutans* formados em biofilme sobre a superfície metálica de acessórios ortodônticos no experimento *in vitro* e o mesmo efeito sobre *S mutans* presentes na cavidade bucal de indivíduos em tratamento ortodôntico no experimento *in vivo*.

7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliação *in vitro* do efeito da TFDA aplicando LED azul ($450\pm 10\text{nm}$) com Curcumina solubilizada em surfactante (SDS) sobre biofilme formado por *S mutans* em superfície metálica de acessórios utilizados no tratamento ortodôntico.

Avaliação *in vivo* do efeito da TFDA aplicando LED azul ($450\pm 10\text{nm}$) com Curcumina solubilizada em surfactante (SDS) sobre *S mutans* na cavidade bucal de indivíduos portadores de aparelhos ortodônticos fixos, utilizando um novo dispositivo de LED intra-bucal com potência média de luz.

Apresentar a TFDA aplicando LED azul ($450\pm 10\text{nm}$) com Curcumina solubilizada em surfactante (SDS) como uma terapia viável para substituir o uso da clorexidina 0,12% em descontaminação bucal.

8 ARTIGO EXPERIMENTO IN VITRO

O artigo a seguir foi publicado originalmente em Journal Physical Science and Application, no volume 4 de 2014. ISSN: 2159-5348

ENHANCEMENT OF THE PHOTODYNAMIC THERAPY EFFECT ON STREPTOCOCCUS MUTANS BIOFILM

^{a,b}V. H. Panhóca*, ^bM. C. Geralde, ^bT. Q. Corrêa, ^aM. T. Carvalho, ^bC. W. O. Souza, ^aV. S.

Bagnato

^aUniversity of São Paulo – USP, Physics Institute of São Carlos – IFSC, Optical Group, Biophotonics Laboratory, São Carlos, SP, Brazil

^bFederal University of São Carlos - UFSCar, Biotechnology Pos-Graduate Program, São Carlos, SP, Brazil

*Corresponding Author: Department of Physics and Material Science, Institute of Physics of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, SP, 13560-970, Brazil

E-mail: vphanhoca@msn.com

ABSTRACT

Biofilm is a community of bacteria, less susceptible to traditional treatments. Although photodynamic therapy (PDT) is a very effective way to microorganism inactivation, in biofilm it is not as efficient as it is in planktonic bacteria cultures. Our objective is to increase the efficiency of PDT by adding one element to the treatment. Therefore, this *in vitro* study evaluates the susceptibility of a biofilm formed by *Streptococcus mutans* on metallic surface of orthodontic accessories under the application of PDT with a surfactant. Samples obtained from blades of orthodontic bands (NiCr), were used as adhesion surface for the biofilm. They were treated with 1 g/mL of curcumin, with 0.1% of sodium dodecyl sulfate and exposed to 30 J/cm²

of light (455nm). Eight experimental groups were studied, including the positive and negative controls. The results show that the group with PDT and surfactant had a significant decrease ($p < 0.001$) in viability. In this case, the reduction observed was of 5.6 log₁₀ (CFU/ml) in comparison to the control group. We have shown that, even though the biofilm is very tough and complex structure, we are able to promote almost the complete inactivation of *S. mutans* in systems similar to an orthodontic treated patient's mouth.

Keywords: Photodynamic Therapy, Light-induced damage, Oral Biofilm, Streptococcus mutans, Curcumin, Surfactant.

INTRODUCTION

There are two forms for bacteria to survive in their natural environment. They may be free-floating, as a planktonic cell, or attached to a surface, as in a biofilm. The biofilm is a complex community in which most of bacteria live. It is a well-organized community that adheres to surfaces and is embedded in an extracellular adherent layer. Bacterial resistance increases when they are organized as biofilm. Also, once in a biofilm, the bacteria display different characteristics from those that they had as a free-floating organism. Biofilms can be found in many places, and the human mouth has perfect conditions for the bacteria to grow.

For that reason, biofilms are precursor for most common oral diseases, such as caries and periodontal disease. Prior to the formation of the biofilm, a thin microorganism layer adheres on the surface of the tooth or gum. These microorganisms use salivary proteins as substrate for adhesion. *Streptococcus mutans* produces adhesins that together with these proteins are used to form the substrate of adhesion. The extracellular substrates that they

produce allow the accession of other types of microorganism to form the mature biofilm, and finally the dental plaque.

The dental biofilm can be categorized into sub- and supra-gingival. It is formed subsequent to an increase of saccharolytic and acidogenic microorganisms, such as *Streptococcus mutans* and *lactobacillus*, which occur in most people who eat sucrose-rich food. Hence, these biofilms produce acids that cause tooth demineralization and caries. Four components are needed to create the carious lesion (1, 2): a host, high-carbohydrate diet, microorganisms and time.

The *Streptococcus mutans*, that may be one of the most common bacteria in the oral cavity, produces a polyhedral matrix to structure the biofilm. The microorganisms existent in a biofilm become sheltered by this polyhedral matrix, reducing the action of antimicrobial agents. Compared to planktonic cells, the biofilm structure protects the bacteria, and other microorganisms. The thickness of this structure prevents contact between antimicrobial agents and microorganisms, keeping the chemicals away from the deeper layers of the biofilm. As a result, the biofilm boosts the growth rate of the microorganisms (2-4). Consequently, microorganisms embedded in biofilms are 10 to 1000 times more resistant to antimicrobial agents (5, 6).

One cause that enhances the biofilm formation in the mouth is the installation of orthodontic accessories (7). The usage of orthodontic accessories creates new retention surfaces for microorganisms in the oral cavity, increasing their retention. Therefore, it increases biofilm formation and the amount of bacteria in the mouth (7). The high level of *S. mutans* in the oral cavity of patients with orthodontic accessories, compared to non-orthodontic treatment patients, is cause both by the presence of the accessories and also by the poor hygiene control of it by the patient.

Photodynamic therapy (PDT) is a well-known medical therapy for cell inactivation and microorganism control (8, 9). This technique is based on the combined use of light and some types of drugs, called photosensitizers (PS), which produce an oxidation reaction. This oxidative reaction can then cause the death or inactivation of selected cells. PDT can also be used as a therapy with a potent antimicrobial effect (10). Inactivation of microorganisms by PDT can ensure several advantages over the traditional use of antimicrobials. First, bacterial killing is rapid, reducing the need to maintain high concentrations of chemicals for long periods, as in the case of antibiotics and antiseptics usage (11). Secondly, bacterial killing is not linked to the intervention of chemicals, so, development of resistance is improbable to happen (12). Finally, since neither the PS, nor the light, are bactericides by themselves, the destruction of bacteria can be controlled by restricting the irradiated region, preventing the destruction of the normal micro-biota elsewhere.

PDT is an alternative therapy for preventing and treating dental caries and periodontal diseases. It is an innovative way to control the formation of the bacterial biofilm, controlling the incidence of these pathogens. Most studies present high efficiency of PDT to planktonic bacteria. On the other hand, since the biofilm protects its microorganisms, the results over clinical trials are not as efficient (13). Therefore, researches over systems that emulate the patients' mouth are so important to find the "perfect therapy". Thus, the purpose of this paper is to evaluate the effect of the antimicrobial activity of PDT on biofilms formed on orthodontic accessories. This *in vitro* study evaluates the use of PDT and a surfactant on metal surfaces, observing the susceptibility of biofilms formed by *S. mutans*. Our objective is to increase the performance of PDT, adding one element to the treatment, in a system that emulates the mouth real environment.

MATERIAL AND METHOD

For this study 24 metal samples measuring 5x5mm were used, obtained from orthodontic band blades (NiCr). On the metal surface, *S. mutans* biofilms were grown and treated with PDT and a surfactant. The PDT was induced by curcumin and light emitting diode (LED) in the blue range, and the surfactant used was the sodium dodecyl sulfate (SDS). There were tested eight experimental groups, each test repeated three times and each solution measured twice.

Biofilm growth and CFU preparation

For *Streptococcus mutans* biofilm, an inoculum from stock culture (ATCC 25175) was grown in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Difco, Detroit, USA) and incubated at 37°C for 24 hours. The suspensions were centrifuged, 3000 rpm per 15 minutes (Excelsa II centrifuge, model 206-BL, FANEM), and the bacterial pellet was dispersed into BHI broth with 20% sucrose. To achieve the desired population density, the culture was adjusted to obtain standardized suspension containing 10^6 cells/ml, the optical density of the final suspensions was verified using a digital spectrophotometer (FEMTO 600).

The biofilm was grown in orthodontic band metal blades (orthodontic appliance - Tecnident, São Carlos, Brazil), cut into 5x5 mm squares, and sterilized in autoclave. Each sample was placed inside individual wells of a 24-well microtiter plate. Then, aliquots of 1ml of the *S. mutans* were transferred to the plates. The biofilms were incubated at 37°C up to 7 days, with the growth medium changed every two days. All the samples were washed in PBS solution and placed in a new well into the 24 microtiter plate to be prepared for experimental treatment. They were separated between eight groups and treated accordingly.

After treatment, the samples and their solutions were transferred to eppendorfs, 1ml of PBS was added, and they were homogenized, to break and loosen the biofilm into the solution, during 8 min in an ultrasound shaker (150 Watts, 50 Hz), before the metal squares were

removed. The solutions were diluted up to 10^{-5} and uniformly spread to petri dishes containing culture medium BHI AGAR (Difco, Detroit, USA) plus 20% sucrose. They were aerobically cultured at 37°C for 48 hours prior to the colony-forming unit (CFU) count.

Experimental treatment procedure

The experimental groups included: control group (P-L-S-); light (P-L+S-), surfactant (P-L-S+) and photosensitizer (P+L-S-) groups; surfactant-light (P-L+S+), photosensitizer-surfactant (P+L-S+) and PDT (P+L+S-) groups; and the PDT-surfactant (P+L+S+) group. Each group was named accordingly to the addition of the photosensitizer (P+ or P-), surfactant (S+ or S-) and application of light (L+ or L-).

All the samples were placed in a new well into the 24 microtiter plate and received the correct solution necessary for treatment. To the control (P-L-S-) and light (P-L+S-) groups, there was added 1 ml of a solution of PBS with 5% of DMSO. There was added 1 ml of surfactant solution to the surfactant (P-L-S+) and surfactant-light (P-L+S+) groups. The surfactant solution was made in PBS with 0.1% of SDS and 5% of DMSO. To the photosensitizer (P+L-S-) and PDT (P+L+S-) groups it was added 1 ml of a photosensitizer solution. This solution had 1 mg/ml of curcumin, and was made in PBS with 5% of DMSO. And to the photosensitizer-surfactant (P+L-S+) and PDT-surfactant (P+L+S+) groups, there was added 1 ml of a photosensitizer-surfactant solution, which had 1 g/mL of curcumin, 0.1% of surfactant, and 5% of DMSO in PBS.

All the experimental groups were kept in the dark for 5 minutes, incubation of the PS, before the application of light in the designated groups. The experimental groups with light (L+) were then irradiated in a home-made blue LED device (high power royal blue LEDs, 355mW, centered at 455 nm with 20 nm bandwidth), for 10 minutes and 54 seconds, ensuring a 30J/cm² dose at all the wells. The LED device (Figure 1), called Biotable (LAT - IFSC - USP),

was made to guarantee uniform distribution of light (46 mW/cm^2 intensity) in the plane where the samples were placed. The experimental groups (L-) where no light was applied were kept in the dark at room temperature, for the same amount of time.

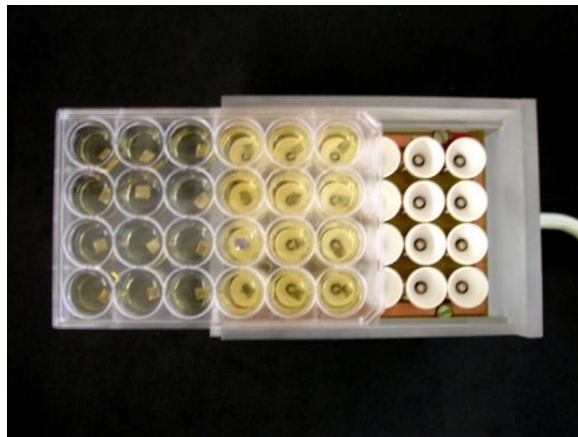


Figure 1 – Photography of the 24-well blue Biotable and details of the metal plate samples, placed in a 24-well microtiter plate, being put in place on the LED device.

Data analysis

The effect of the photodynamic therapy and surfactant on the biofilms was evaluated by counting colony-forming units. The results were statistically evaluated by ANOVA, differences were considered when $p < 0.05$. The difference between treated groups with the control group (P-L-S-) was made with the OneWay ANOVA with post hoc Turkey.

RESULTS AND DISCUSSION

To ensure biofilm formation, selected metallic samples were imaged with confocal microscopy (Figure 2). The images showed the formation of *S. mutans* biofilm after 7 days of cultivation on the metallic samples of orthodontic appliance (NiCr). The photodynamic inactivation was also observed, by means of a live-dead biological marker, imaging plate before and after PDT treatment. The confocal reflection images show the metal surface, indicating the presence of colonies of *S. mutans*. The confocal fluorescence images show the fluorescence of the propidium iodide (PI) dye and curcumin in the bacteria cells. The colonies can be highlighted when both images are superposed, showing the correspondence between the colonies seen by the reflection and fluorescence images.

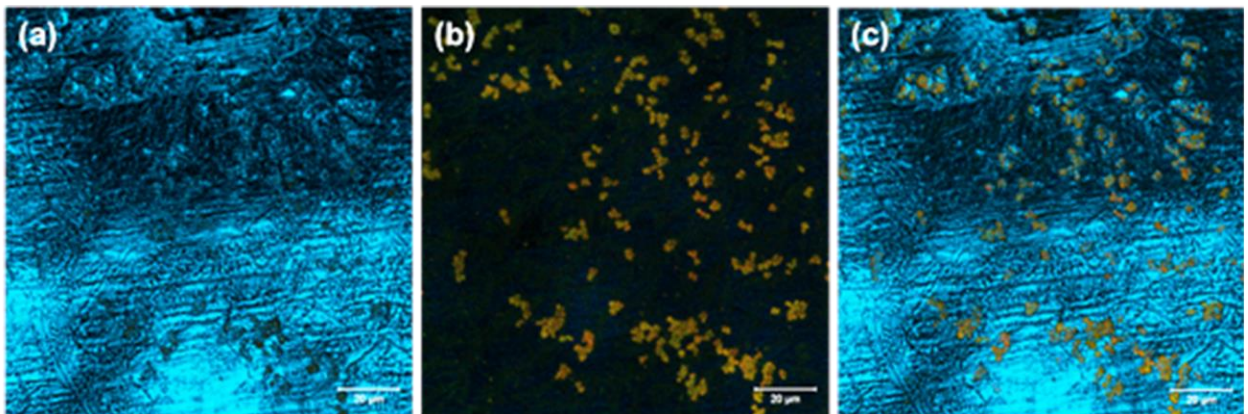


Figure 2 - Biofilms of *S. mutans* on metallic sample with 7days, after PDT treatment: (a)

Confocal reflection imaging, the image show the appearance of the metal surface, indicating the presence of *S. mutans* colonies. (b) Confocal fluorescence image, showing the fluorescence of the propidium iodide (PI) dye and curcumin. The colonies appear as bright spots in the image, red indicates dead cells and yellowish-green show the living microorganisms. (c) Reflection and fluorescence images superposed (a+b). The image shows the correspondence among the colonies seen by reflection and fluorescence images. The scale bar corresponds to 20 µm.

The confocal reflectance images present the surface of the metal sample. It was expected that the orthodontic appliance squares show some roughness, and appears in the image as a random pattern. It is also noticed a pattern similar to a bunch of grapes, and the superposition of the reflectance and fluorescence images confirm that those patterns correspond to the biofilm. Meanwhile, the fluorescence image show red and yellow-green dots. The yellow-green dots are the fluorescence of the curcumin within the bacteria cells. The red dots are the fluorescence if the propidium iodide (PI) dye, which appear in the dead cells.

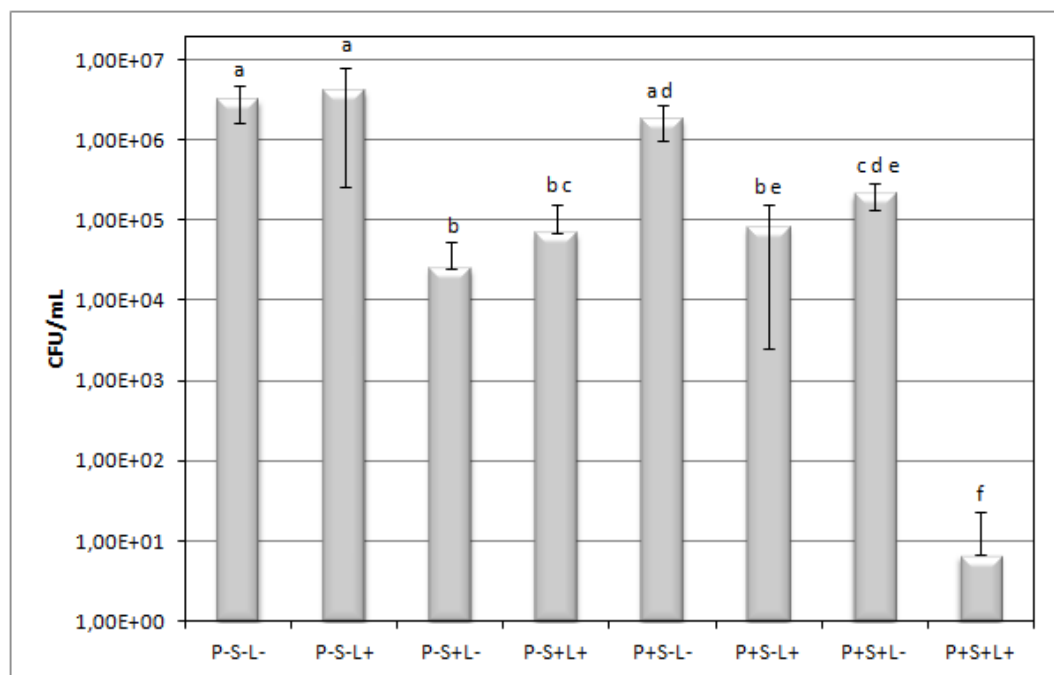


Figure 3 - Reduction of CFU for *S. mutans* biofilms. Individual difference made by ANOVA One Way - post hoc Turkey. Groups with the same letter are not significantly different ($p > 0,005$).

The bacterial effects of PDT and the surfactant were evaluated by the cell viability (CFU/ml). The efficacy of the treatment differs depending on the association of curcumin and surfactant (Figure 3). They showed significant reductions in the viability of the *S. mutans* (over 1 log₁₀) for all groups, except for the experimental conditions (P-L-S+) and (P+L-S-). The

highest reduction in the cell viability of the biofilms was equivalent to 5.6 log₁₀ (CFU/ml) and correspond to the association of PDT and surfactant.

The results show remarkable behavior of the bacteria population depending on the association of curcumin, surfactant and the application of light (Table 1). In some cases the illumination can promote biostimulation, but none of the studied cases presented a relatively relevant increase on the bacterial population. Applying just PDT (P+S-L+) or surfactant (P-S+L-), it was observed small decreases on the *S. mutans* population. The same occur when light was applied mutually with surfactant (P-S+L+), but in this case the antibacterial effect was somehow smaller. The test group where only the photosensitizer was used (P+S-L-) was statistically similar to the control group, confirming that curcumin, by itself, is not capable to a significant bacteria inactivation. On the other hand, the association of curcumin and SDS (P+S+L-) upheld an even smaller decrease in the population. However, when the three were used together (P+S+L+), it was observed a huge antibacterial effect (-5.6 log₁₀). In this case, only one in a thousand part of the population survived.

Table 1- Expression of cell viability (CFU/ml), related to the control group data, for all experimental groups. Groups with the same letter are not significantly different (p>0,005).

Experimental groups	CFU Percentage difference	Expression (log ₁₀)
(P-S-L-) ^a	0	
(P-S-L+) ^a	+29.17	+0.1
(P-S+L-) ^b	-99.22	-2.1
(P-S+L+) ^{b c}	-97.84	-1.6
(P+S-L-) ^{a d}	-42.91	-0.2
(P+S-L+) ^{b e}	-97.46	-1.5
(P+S+L-) ^{c d e}	-93.37	-1.1
(P+S+L+) ^f	-99.999792	-5.6

The oral microbiota is composed of more than 500 types of microorganisms, even though *S. mutans* is the etiologic agent of caries and demineralization. It is also responsible for the adhesion, colonization and dental biofilm formation (14). This study evaluated particularly the susceptibility of *S. mutans* biofilm on the metal surface (NiCr) of orthodontic blade band by means of photodynamic therapy with curcumin (1mg/ml), 0.1% of SDS and LED illumination. As expected, we have shown that photodynamic therapy reduces the number of living cells of *S. mutans* in a biofilm model created on metallic surface (15-17). The presence of photosensitizer, without irradiation, was not able to achieve an effective antibacterial outcome. This confirms the essential rule of light to obtain an anti-microbial effect (18, 19) by means of PDT.

The most significant finding was the lack of viability of *S. mutans* on the surfaces of the samples treated with curcumin combining PDT with surfactant. The result for this group (P+S+L+) is above the minimal bactericidal concentration, which is the minimum concentration able to reduce 4 log₁₀ on the survival of a microorganism (20). Significant decrease on the viability of microorganisms was also observed when biofilms were exposed to the surfactant alone (P-S+L-), surfactant with light (P-S+L+), photosensitizer with light (P+S-L+), or the combined use of surfactant and curcumin without light (P+S+L-), compared to the control group (P-S-L-). For these groups, the reduction on the bacteria viability was above 90%. Depending on the application, 90% of reduction on a microorganism population might be sufficient. Although the results show that the bacterial inactivation can be almost complete when the surfactant was used together with PDT.

The surfactants are amphipathic molecules composed of a hydrophobic portion and a hydrophilic portion. The first is often a nonpolar hydrocarbon chain, while the second can be ionic (cationic or anionic), nonionic or amphoteric. The surfactants, for their biochemical

characteristics, are highly potent and act as emulsifiers, reducing interfacial and superficial tension (21). They are responsible for modifications on the ion channels of the bacterial membrane via trans-membranes proteins, similar to the porins. This allows the passage of solutes through the membrane, increasing the permeability of these membranes (21-24). Surfactants also work as: emulsifiers, dispersing in water hydrocarbons or other insoluble compounds; reducing the adhesion and releasing surfaces cell; and presenting antibiotic activity.

The mechanism of action of PDT is not connected to the mediation of chemical radicals acting in a single target, which is the case of the antibacterial products. Photosensitizers act producing reactive oxygen species (ROS) which have no specific site of action. This avoids the formation of strains resistant to antibiotics (20, 21, 25, 26). Photodynamic therapy applied as antimicrobial therapy can be also advantageous over mechanical removal methods, since it can reach places such as recesses and protrusions of the orthodontic accessories (27). It may also enable safe treatment of patients with special needs or difficulty in oral hygiene during orthodontic treatment, avoiding oral infections, such as dental caries, gingivitis and periodontal pockets (13, 27).

Several hypotheses could explain the synergism of the PDT action with surfactant as antimicrobial therapy in *S. mutans* biofilm. The surfactant could be increasing the number of working cycles of PS, protecting it from oxidation, and increasing the efficacy of PDT. It could also be acting increasing the permeability of the curcumin through the cell membrane, increasing the concentration of PS molecules in the bacteria. One other hypothesis is that the surfactant is breaking the biofilm structure, and this allows the PDT to be more effective. Although the surfactant, SDS, can be used as antimicrobial by itself, the combined effects of it with PDT cannot explain such efficacy of the treatment. The reduction on bacteria viability was

larger than one could expect from using both treatments separately. Therefore more studies must be done in order to thoroughly understand this mechanism.

CONCLUSIONS

The result of this study shows higher reduction in the *S. mutans* population, compared to previous investigations (15, 19). We demonstrate significant removal of *S. mutans* biofilm after application of PDT with SDS as antimicrobial therapy. PDT associated to surfactants promoted a high inactivation of *S. mutans* biofilm (5.6 log₁₀) on the surface of metallic orthodontic accessories. We have shown that, even though the biofilm is very tough and complex structure, we are able to promote almost the complete inactivation of *S. mutans* in a system similar to an orthodontic treated patient's mouth. And this inactivation was achieved with a protocol that does not promote bacterial resistance that applied PDT and SDS.

Given the findings, our results suggest that the surfactant acts on the microorganisms' membrane making them permeable to solutes, and breaking the biofilm structure. The surfactant leads to higher the input of oxygen molecules and curcumin from the extracellular medium into the microorganism. Therefore, the synergistic action of the SDS and PS produces higher amounts of reactive oxygen species (ROS) upon irradiation, optimizing the antimicrobial effect of PDT. At the same time, protecting the PS molecules from oxidation and increasing its lifetime of the PDT cycle. These hypotheses should be put to test in supplementary investigations.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to acknowledge the support of the Brazilian agencies FAPESP, CNPQ and CAPES, through founding and scholarships. V. H. Panhóca would like to acknowledge scientific contributions and helpful advice from Clóvis Grecco and Fernanda Rossi Paolillo.

REFERENCES

1. P. H. Keyes, "The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications," *Arch Oral Biol* 1(304-320 (1960)
2. E. Newbrum, *Cariology*, Baltimore (1978).
3. T. Fusayama and S. Terachima, "Differentiation of two layers of carious dentin by staining," *J Dent Res* 51(3), 866 (1972)
4. T. Fusayama and S. Terashima, "Differentiation of two layers of carious dentin by staining," *Bull Tokyo Med Dent Univ* 19(1), 83-92 (1972)
5. M. J. Sedlacek and C. Walker, "Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model," *Oral Microbiol Immunol* 22(5), 333-339 (2007)
6. C. R. Fontana, A. D. Abernethy, S. Som, K. Ruggiero, S. Doucette, R. C. Marcantonio, C. I. Boussios, R. Kent, J. M. Goodson, A. C. Tanner and N. S. Soukos, "The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms," *J Periodontal Res* 44(6), 751-759 (2009)
7. J. A. Corbett, L. R. Brown, H. J. Keene and I. M. Horton, "Comparison of *Streptococcus mutans* concentrations in non-banded and banded orthodontic patients," *J Dent Res* 60(12), 1936-1942 (1981)
8. S. George, A. Kishen, "Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection," *Journal of Biomedical Optics* 12(3), 034029 (2007)
9. R. Darlenski, J. W. Fluhr, "Photodynamic therapy in dermatology: past, present, and future," *Journal of Biomedical Optics* 18(6), 061208 (2012)
10. M. Wainwright, "Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42(1), 13-28 (1998)

11. H. Greenwell and N. Bissada, "Emerging concepts in periodontal therapy," *Drugs* 62(18), 2581-2587 (2002)
12. P. Bidault, F. Chandad and D. Grenier, "Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology," *Journal of the Canadian Dental Association* 73(8), 721-725 (2007)
13. N. Araujo, C. Fontana, M. Gerbi and V. Bagnato, "Overall-Mouth Disinfection by Photodynamic Therapy Using Curcumin," *Photomedicine and Laser Surgery* 30(2), 96-101 (2012)
14. J. Kreth, E. Hagerman, K. Tam, J. Merritt, D. T. Wong, B. M. Wu, N. V. Myung, W. Shi and F. Qi, "Quantitative analyses of *Streptococcus mutans* biofilms with quartz crystal microbalance, microjet impingement and confocal microscopy," *Biofilms* 1(4), 277-284 (2004)
15. Z. Zou, P. Gao, H. Yin and Y. Li, "Investigation of photodynamic therapy on streptococcus mutans of oral biofilm," *Chinese Optics Letters* 6(12), 947-949 (2008)
16. J. Giusti, L. Santos-Pinto, A. Pizzolito, K. Helmersen, E. Carvalho-Filho, C. Kurachi and V. Bagnato, "Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source," *Photomedicine and Laser Surgery* 26(4), 281-287 (2008)
17. I. C. Zanin, M. M. Lobo, L. K. Rodrigues, L. A. Pimenta, J. F. Höfling and R. B. Gonçalves, "Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode," *Eur J Oral Sci* 114(1), 64-69 (2006)
18. J. O'Neill, C. Hope and M. Wilson, "Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue," *Lasers in Surgery and Medicine* 31(2), 86-90 (2002)

19. M. Schneider, G. Kirfel, M. Berthold, M. Frentzen, F. Krause and A. Braun, "The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model," *Lasers in Medical Science* 27(3), 615-620 (2012)
20. G. Jori, C. Fabris, M. Soncin, S. Ferro, O. Coppellotti, D. Dei, L. Fantetti, G. Chiti and G. Roncucci, "Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications," *Lasers Surg Med* 38(5), 468-481 (2006)
21. P. A. V. Fernandes, I. R. d. Arruda, A. F. A. B. d. Santos, A. A. d. Araújo, A. M. S. Maior and E. A. Ximenes, "Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria," *Brazilian Journal of Microbiology* 38(704-709) (2007)
22. F. Peypoux, J. M. Bonmatin and J. Wallach, "Recent trends in the biochemistry of surfactin," *Appl Microbiol Biotechnol* 51(5), 553-563 (1999)
23. M. Nitschke and G. M. Pastore, "Biossurfactantes: propriedades e aplicações," *Química Nova* 25(772-776) (2002)
24. J. P. Lyon, R. R. Rezende, M. P. Rabelo, C. J. de Lima and L. M. Moreira, "Synergic effect of photodynamic therapy with methylene blue and surfactants in the inhibition of *Candida albicans*," *Mycopathologia* 175(1-2), 159-164 (2013)
25. F. Lauro, P. Pretto, L. Covolo, G. Jori and G. Bertoloni, "Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates," *Photochemical & Photobiological Sciences* 1(7), 468-470 (2002)
26. A. Tavares, C. M. Carvalho, M. A. Faustino, M. G. Neves, J. P. Tomé, A. C. Tomé, J. A. Cavaleiro, A. Cunha, N. C. Gomes, E. Alves and A. Almeida, "Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment," *Mar Drugs* 8(1), 91-105 (2010)

27. T. S. Mang, D. P. Tayal and R. Baier, "Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms," *Lasers Surg Med* 44(7), 588-596 (2012)

9 ARTIGO EXPERIMENTO IN VIVO

O artigo a seguir foi submetido em periódico internacional.

ORAL DECONTAMINATION USING ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY APPLIED IN ORTHODONTIC PATIENTS.

Panhóca, V.H.^{1,2,a}, Florez, F.L.E.^{3,b}, Corrêa, T.Q.^{1,c}, Souza, C.W.O.^{1,d}, Bagnato, V.S.^{2,d}.

¹ Biotechnology Graduate program, Federal University of São Carlos.

² São Carlos Institute of Physics, Group of Optics, University of São Paulo.

³ College of Dentistry, Department of Dental Materials, University of Oklahoma Health Sciences Center.

^a Clinical Researcher and Ph.D. Student.

^b Postdoctoral Fellow.

^c Ph.D. Student.

^d Full Professor.

All authors have completed and submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest, and none were reported.

Address correspondence to: Fernando Luiz Esteban Florez, D.D.S., M.S, Ph.D.

Department of Dental Materials, College of Dentistry, The University of Oklahoma Health Sciences Center.

1201 North Stonewall Avenue.

Oklahoma City, Oklahoma. 73117

E-mail: fernando-esteban-florez@ouhsc.edu

Abstract

The installation of the orthodontic appliances promotes an increase in the retentive area available for microbial aggregation, difficult the oral health promotion and, in addition, promotes the artificial selection of biofilms containing a higher load of pathogenic microorganisms. In this way, it becomes of critical importance, the development of techniques that might aid in the reduction of the oral microbial load. One possible approach is the use of the Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT). In this direction, the objective of this study was to assess the clinical utility of the APDT and the association of the APDT with the SDS surfactant as oral decontamination agents in orthodontic patients. The selected patients (n=24)

were randomly distributed within seven experimental groups: G1 - Negative control, G2 - Curcumin mouthwash, G3 - Curcumin mouthwash+SDS, G4 - light irradiation, G5 - APDT, G6 - APDT+SDS and G7 - Positive Control (Chlorhexidine mouthwash). Non-stimulated saliva samples were collected from each one of the patients in three steps (S), as follows: S1 - Initial condition, S2 - Treatment with mouthwashes (water, Chlorhexidine or Curcumin) and S3 - After APDT treatment. The efficacy of the proposed treatment protocols was assessed in function of the survival fraction observed in each group. The obtained results were statistically analyzed using variance analysis ANOVA Kruskal-Wallis test. The statistical analysis demonstrated that only the groups 6 (APDT+SDS) and 7 (Chlorhexidine 0.12%) has presented bacterial inactivation results that were statistically significant differences ($p < 0.05$) from the results observed in the group 1 (negative control). These results indicate that the APDT when associated with the SDS surfactant can be used as a coadjuvant and convenient agent to promote the oral decontamination in vivo.

Introduction

The dental specialty that is dedicated to the study, prevention and treatment of dentofacial alterations is known as Orthodontics. Its main objective is to attain a more balanced relation of position between teeth, facial arches and facial bones through the use of orthodontic appliances. Dental brackets, wires and metallic bands are some of the components that commonly are used during this kind of treatment¹.

Once these components had been adapted over tooth surfaces (buccal or lingual), the patient experiences a drastic decrease in his ability to properly perform their routine oral hygiene and, at the same time, the installation of these devices, will also promote a significant increase on the amount of available surfaces for bacterial aggregation. This problem is exacerbated even further, because the microorganisms present in the oral microflora preferentially aggregate on dental materials surfaces, such as, restorative materials (amalgam and composite resins) and orthodontic appliances^{2,3}.

The microbial aggregation leads to the formation of a multi-species community, known as dental biofilms or dental plaque that harbors more than 700 different microorganisms species⁴. When in its biofilm phase, the microorganisms deposit an extracellular matrix composed by proteins and polysaccharides that confers to them protection against external and environmental aggressors such as, antimicrobial agents, temperature changes and mechanical

dislodgement. Published studies on the matter have shown that, microorganisms in biofilms have 10 to 1000 times higher resistance levels to antimicrobial agents, when compared with the antibacterial resistance observed for the same microorganisms in its planktonic phase^{5,6}. Other studies had also shown that patients under orthodontic treatment have higher *Streptococcus mutans* loads when compared with patients without the use of orthodontic appliances.

The biofilm growth during the evolution of the orthodontic treatment, will promote the establishment of a degradation cycle that might result initially in the appearance of white lesions (ICDAS - 0, 1 and 2) around the brackets' attachment sites and active carious lesions (ICDAS - 3 to 6) around the metallic bands⁷⁻⁹.

Preventive measures to avoid the installation and progression of caries diseases include oral hygiene instructions (brushing techniques, flossing techniques, use of mouthwashes, etc.), orientation about the impact of dietary habits on patient's overall oral health, prescription of fluoride toothpastes (≥ 1000 ppm) and mouthwashes. In this direction, and taking into consideration, the concepts of prevention and minimum intervention currently recommended by modern Dentistry, it becomes of critical importance, the development of techniques, products and devices that can aid the maintenance of daily oral health⁹.

One alternative currently available to control the microbial load in the oral cavity is the Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT)¹⁰⁻¹². Its mechanism of action is based on the organic molecules oxidization through the generation of reactive oxygen species (ROS) mediated by light^{13,14}. Studies published in the literature had demonstrated the obtainment of varying degrees of success for both Gram-positive and Gram negative microorganisms¹⁵. In addition, these studies had also emphasized that, in function of the non-specific nature of the oxidative reaction, it is unlikely that the repeated use of the APDT will promote the development of resistant bacterial strains^{10,13,16,17}.

However, some evidences published on current literature show that, regardless of photosensitizers' type and concentration, wavelengths, power output and irradiation times investigated, the levels of bacterial inactivation obtained for oral cariogenic biofilms using APDT are still very low^{18,19}. Therefore, and in order to obtain bacterial inactivation levels that are comparable to the current gold standard for oral decontamination (i.e. Chlorhexidine), several research groups have been investigating the use of APDT together with some permeability promoters, such as EDTA and polycationic nanopeptides (PMBN)^{20,21}.

Modern strategies combine some antimicrobial agents with a variety of surfactants. The molecular structure of these compounds are composed by a hydrophobic (non-polar) and a hydrophilic portion capable of exerting tensioactive properties of great importance and great economic value for pharmaceutical, medical and hygiene product industries^{22,23}. Studies in the literature suggest that the mechanism of action of such components may increase the bacterial cells' extracellular permeability by promoting an electrical charge unbalance that will lead into a higher penetration of the antimicrobial agent inside of the cells which, consequently, will lead into the attainment of higher levels of bacterial inactivation^{20,21}.

Hence, the present clinical and randomized study investigated the synergistic effect of the surfactant Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) on the levels of inactivation of *Streptococcus mutans* promoted by the use of the APDT using Curcumin as photosensitizer. The null hypothesis tested was, that the attainment of higher inactivation levels does not depends on the addition of SDS to the Curcumin photosensitizer.

Material and Methods:

The Ethics Committee in Human Beings of the São Carlos Federal University (UFSCAR) approved the execution of the present clinical and randomized study under protocol 258.461 (2013) and title "Optimization of the antimicrobial effect of Photodynamic Therapy on *Streptococcus mutans* in patients with orthodontic appliances". The study was registered with NIH ClinicalTrials (NCT02337192).

Inclusion and Exclusion criteria

A total of 50 patients currently under orthodontic treatment from São Carlos city and surrounding region, were examined in a dental office to verify if the individuals screened would attend to the inclusion and exclusion criteria established for this clinical study. From the initial population, 24 individuals with ages ranging from 18 and 50 years old, were selected in function of the following inclusion criteria: being under fixed orthodontic treatment, absence of clinical signs of periodontal disease, not used antibiotics 90 days prior to the participation on this study and not use fluoride mouthwashes. The exclusion criteria were: signs of uncontrolled systemic diseases (diabetes, high blood pressure and heart conditions), breast feeding or pregnant women, patients with oral tumors and patients with history of allergy to any of the materials used, such as Curcumin and Chlorhexidine.

Experimental groups and Conditions

After the screening process and selection, patients were randomly distributed in each one of the experimental groups described in Table 1 through a simple draw, in order to investigate the effect of the use of the SDS on the attainment of higher levels of bacterial inactivation with the use of the APDT as an oral decontamination agent.

GROUPS N=24	TREATAMENTS	APPLICATION PROTOCOLS		
		Swishing time (s)	Irradiation Time (s)	Power Output (mW/cm ²)
1	DMSO water solution at 5% (Negative control)	120 s	0	0
2	Swish with Curcumin	120 s	0	0
3	Swish with Curcumin + SDS	120 s	0	0
4	Irradiation with blue light	120 s	2x 180	212 & 34.5
5	APDT	120 s	2x 180	212 & 34.5
6	APDT + SDS	120 s	2x 180	212 & 34.5
7	Chlorhexidine (Positive control)	30 s	0	0

Table 1. Description of experimental groups and conditions.

Saliva collection

The collection of non-stimulated saliva (n=3; 3mL/collection) were performed at the following steps: i) immediately before the swishing (Curcumin, Chlorhexidine or water), ii) after swishing and iii) after performing the APDT treatments. To that end, 15 mL sterile polypropylene tubes were used (Falcon, BD Science, Durham, NC). After each saliva collection, the saliva samples were identified and stored in a dark and refrigerated environment. The samples of each patient in each experimental step were used to determine the total bacterial load.

Preparation of the photosensitizer agent

The photosensitizer agent used in the APDT experimental groups (Groups 2, 3, 5 and 6) was prepared immediately before its use for each one of the treated patients. The photosensitizer was obtained by diluting 0,03g of the Curcumin salt (PDT Pharma - Cravinhos, Brazil) in 1,5mL of dimethyl sulfoxide at 5% (DMSO - Labsynth, Diadema, Brazil). Following, this solution was further diluted in 30mL sterile distilled water, in order to obtain a final Curcumin concentration of 1g/L. In the cases where the photosensitizer was used in combination with the surfactant, 0,03g of the Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, Labsynth, Diadema, Brazil) were added at the final stage of the photosensitizer's preparation.

Photodynamic Therapy

The patients pertaining to the experimental groups 5 and 6 (APDT and APDT + SDS, respectively) performed the swishing with the proper photosensitizer. Following, the buccal and lingual surfaces of teeth were irradiated (180s/ surface; total irradiation time of 360s) using two distinct blue LED devices (buccal irradiation - Bright Max Evolution, $450 \pm 10\text{nm}$, 33.54mW/cm^2 , São Carlos, Brazil; Lingual irradiation - LAT Prototype, IFSC/USP, $450 \pm 10\text{nm}$, 212mW/cm^2 , São Carlos, Brazil). The swishing and irradiation procedures were performed according with the times and conditions described in Table 1.

Microbiological assessment

Saliva samples (100 μL) from each one of the patients, in each one of the collection steps ($n=3$, described previously), were serially diluted in 1,5mL microcentrifuge tubes (Perfecta, São Paulo, Brazil) containing 900 μL of PBS (BIOGEN, Ribeirão Preto, Brazil) up to the 10^{-5} dilution. Following, aliquots (25 μL) of each dilution were plated (in duplicate) in Petri dishes containing Mitis Salivarius culture medium (BD Difco, Franklin Lakes, USA) supplemented with 0,01g of bacitracin. After the plating, the Petri dishes were maintained at 37°C for 48 hours. After the growth period, the colonies were counted visually and the obtained values were adjusted to UFC/mL.

Statistical Analysis:

The obtained data was submitted to a statistical analysis with a 95% confidence level using the Statistica 7.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK). The data was tested for its normality

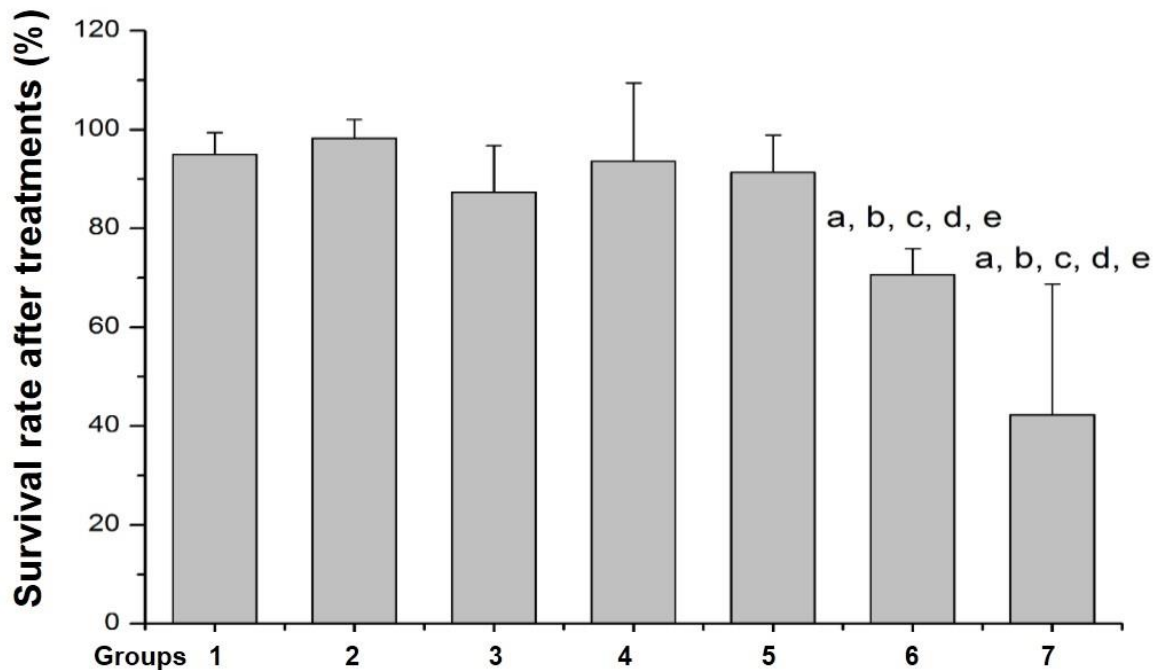
and for its homoscedasticity of the variances using respectively the Shapiro-Wilk and Levene tests. Following, the normalized data was submitted to a two-way ANOVA with repeated measures. The independent factors were Group (irradiation, APDT and APDT + SDS) and Step (before swishing, after swishing and after treatment), which were also considered as repeated measures. The Tukey post-hoc test was used only in the groups where statistically significant differences were observed. The significance of bacterial survival rates in each step investigated was analyzed with the ANOVA Kruskal-Wallis test.

Results:

The results obtained in the present clinical and randomized study, demonstrate the efficacy of the proposed treatments in function of the bacterial survival rate observed in each step investigated. So, the lower the bacterial survival rate, the higher the inactivation level achieved by the treatment imposed. The results' graph displays the mean and standard deviation values of the bacterial survival rate observed for each condition studied. Also, it can be observed the existent differences between the values obtained in the experimental groups (Groups 2, 3, 4, 5 and 6) can be observed in comparison with the values obtained for the control groups (Group 1, Negative control and Group 6, Positive control).

Groups	Treatments	Survival Rate after treatments (%)
1	DMSO water solution at 5% (Negative control)	94.93 ± 4.38
2	Swish with Curcumin	98.26 ± 3.75
3	Swish with Curcumin + SDS	87.35 ± 9.39
4	Irradiation with blue light	93.58 ± 15.87
5	APDT	91.33 ± 7.54
6	APDT + SDS	70.65 ± 5.23
7	Chlorhexidine (Positive control)	42.29 ± 26.39

Table 2. Bacterial survival rates after the treatments



Graph 1. Bacterial survival rates after the treatments.

Discussion:

The placement of orthodontic appliances increases significantly the available retentive area for accumulation and growth of oral bacteria^{2,3}. The imbalance of the host's oral microflora in association with factors such as, the difficulty to perform adequate oral hygiene, entrapment of dietary residues for long periods of time and a diet rich in fermentable carbohydrates will result in the artificial selection of some oral pathogenic bacteria, like *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*²⁴.

When adhered onto a surface, the microorganisms in the biofilm start to deposit an extracellular polymeric matrix that gives them protection against the most diverse external aggressor agents. Several studies had shown that microorganisms in biofilms exhibit 10 to 1000 times higher resistance to the use of antimicrobial agents when compared with the resistance observed for their planktonic counterparts^{5,6}. These studies had also shown that some factors such as, the tridimensional localization of the microorganisms within the biofilm, growth rate and biofilm thickness are critical factors related with the increased resistance observed^{25,26}.

The progression and growth of oral biofilms promotes the establishment of a demineralization/remineralization cycle that can be characterized clinically through the appearance of white spots in the surrounding areas of dental brackets and metallic bands^{8,9}. This cycle's progression leads into the complete dissolution of enamel rods and to the establishment

of an active carious process. Tooth brushing using fluoride toothpastes still is the most used technique to control the microbial load in the oral cavity. However, some studies have shown a positive correlation between the use of orthodontic appliances and the high incidence of bacterial origin diseases observed in orthodontic patients.

This correlation indicates that the association between the patient's inability to maintain adequate levels of oral hygiene and the increase in the area available for bacterial aggregation plays a major role on the patient's overall oral health outcome². Therefore, it becomes of fundamental importance, the development of novel methods, devices and products that can aid in the maintenance of adequate levels of oral health by promoting the decrease of oral microbial load through a decontamination process.

In function of such a need, the antimicrobial photodynamic therapy appears nowadays, as an important alternative among the decontamination approaches that are currently under investigation to promote the control of the oral microbial load^{27,28}. This therapy has its mechanisms of action based on the generation of reactive oxygen species (ROS), capable of promoting bacterial death through a non-specific oxidoreductive process^{14,27}. The literature points out that it is unlikely that this mechanism of action will promote the appearance of resistant bacterial strains from the recurrent use of this therapy^{10,13,16,17}.

The results published by Araujo et.al. in 2012 demonstrate that the antimicrobial photodynamic therapy, when performed using visible wavelengths ($470 \pm 15\text{nm}$), at low intensity irradiation levels ($5,7\text{J}/\text{cm}^2$) and using Curcumin as photosensitizer ($1,5\text{g}/\text{L}$), was able to eradicate *Streptococcus mutans* planktonic cultures¹⁸. In a different direction, a study published by Paschoal et.al. in 2013, demonstrated that the antimicrobial photodynamic therapy using higher doses of energy (48 e $72\text{J}/\text{cm}^2$) associated with Curcumin ($4000\mu\text{M}$) promoted the obtainment of moderate microbial inactivation levels that had varied between 60.66 and 71.07%²⁹.

More recently, an in vitro study performed in our laboratory has demonstrated the antimicrobial effect of the photodynamic therapy in *Streptococcus mutans* biofilms using visible wavelength ($455 \pm 15\text{nm}$) in low intensity irradiation levels ($30\text{J}/\text{cm}^2$) with Curcumin ($1\text{g}/\text{L}$) associated with SDS surfactant (0.1%)²¹. The results obtained in this study demonstrated the attainment of bacterial inactivation levels of 5.6 logs when compared with the control group (no treatment) results. This study allowed us to conclude that the inactivation levels reported

were related with the fact that the antimicrobial photodynamic therapy was performed in the presence of the SDS surfactant.

According with the literature, this class of chemical compounds acts by decreasing the superficial free tension between the photosensitizer and the microorganisms, at the same time that increases their trans-membrane permeability²⁰. This two-fold effect guarantees a higher photosensitizer concentration inside of the cells, which ultimately will permit the obtainment of a more optimized photodynamic reaction. The results obtained from the use of the photodynamic therapy in combination with the surfactant SDS was the attainment of higher levels on bacterial inactivation.

Therefore, the objective of the present study was to investigate the antimicrobial effect of the photodynamic therapy in the presence of the surfactant SDS on orthodontic patients (groups and experimental conditions described in Table 1.), in order to determine this therapy's potential as an accessory oral decontamination agent.

The results obtained in the groups 2 and 3, that had used as the treatment only the swishing with the Curcumin photosensitizer (associated or not with the SDS), were comparable ($p > 0.05$) with the results obtained for the group 1 (negative control). Similar behavior ($p > 0.05$) was also observed in the comparison performed between the results obtained for the group 4, that investigated the antimicrobial effect promoted by the isolated use of the investigated wavelength, and the results obtained for the group 1 (negative control).

The results obtained with the group 6 (APDT + SDS) displayed the lowest microorganisms survival rates among all groups investigated, which indicate that this treatment was the most effective when compared with the bacterial inactivation levels obtained with the remaining groups. However, the comparison between groups 6 (APDT + SDS) and 7 (positive control) demonstrate clearly that, despite statistical significant differences had not been observed ($p > 0.05$) between the two groups considered, the bacterial inactivation levels observed in the group 6 (APDT + SDS) suggests that the investigated treatment protocol was not capable to decrease the oral microbial load in levels comparable to the bacterial inactivation levels observed for the group that used Chlorhexidine as treatment^{30,31}.

The results of the present study suggest that the antimicrobial photodynamic therapy can be used as an accessory decontamination agent to conventional treatments. Furthermore, the obtained results lead us to reject the null hypothesis that the higher inactivation levels does not depends on the addition of SDS to the Curcumin photosensitizer.

Conclusions

Having in consideration the conditions and limitations of the present study, we can draw the following conclusions:

1. The isolated use of either the wavelength investigated, or the Curcumin photosensitizer, resulted in bacterial inactivation levels that were comparable ($p>0.05$) to the results obtained in the negative control.
2. The antimicrobial photodynamic therapy (Group 5) was able to produce a statistical significant decrease in the *Streptococcus mutans* load in orthodontic patients.
3. The antimicrobial photodynamic therapy associated with the SDS surfactant (Group 6) displayed statistical significant reductions ($p<0.05$) when compared with the negative control group
4. The Chlorhexidine (Group 7) presented bacterial inactivation levels that were statistically significant ($p<0.05$) when compared with the negative control group. The bacterial inactivation levels obtained in this group classify it as the highest reduction of the initial *Streptococcus mutans* population among all groups tested.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support of the Brazilian agencies FAPESP, CNPq, CAPES and would like also to acknowledge the significant scientific contributions of Clovis Grecco and Fernanda Rossi Paolillo.

References

1. Iliadi A, Baumgartner S, Athanasiou A, Eliades T, Eliades G. Effect of intraoral aging on the setting status of resin composite and glass ionomer orthodontic adhesives. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2014;145:425-433.

2. Corbett J, Brown L, Keene H, Horton I. Comparison of Streptococcus mutans concentrations in non-banded and banded orthodontic patients. *Journal of Dental Research* 1981;60:1936-1942.
3. Scheie A, Arneberg P, Krogstad O. Effect of orthodontic treatment on prevalence of Streptococcus Mutans in plaque and saliva. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1984;92:211-217.
4. Marcotte H, Lavoie M. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998;62:71-+.
5. Sedlacek M, Walker C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiology and Immunology* 2007;22:333-339.
6. Fontana C, Abernethy A, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio R et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *Journal of Periodontal Research* 2009;44:751-759.
7. Ismail A, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 2007;35:170-178.
8. Martignon S, Ekstrand K, Lemos M, Lozano M, Higuera C. Plaque, caries level and oral hygiene habits in young patients receiving orthodontic treatment. *Community Dental Health* 2010;27:133-138.
9. Richter A, Arruda A, Peters M, Sohn W. Incidence of caries lesions among patients treated with comprehensive orthodontics. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2011;139:657-664.

10. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine* 2006;38:468-481.
11. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 2005;79:159-170.
12. Eduardo C, de Freitas P, Esteves-Oliveira M, Aranha A, Ramalho K, Simoes A et al. Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. A review. *Lasers in Medical Science* 2010;25:781-792.
13. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998;42:13-28.
14. Jiang Y, Leung AW, Hua H, Rao X, Xu C. Photodynamic Action of LED-Activated Curcumin against *Staphylococcus aureus* Involving Intracellular ROS Increase and Membrane Damage. *International Journal of Photoenergy* 2014;2014.
15. Prasanth C, Karunakaran S, Paul A, Kussovski V, Mantareva V, Ramaiah D et al. Antimicrobial Photodynamic Efficiency of Novel Cationic Porphyrins towards Periodontal Gram-positive and Gram-negative Pathogenic Bacteria. *Photochemistry and Photobiology* 2014;90:628-640.
16. Maisch T. A New Strategy to Destroy Antibiotic Resistant Microorganisms: Antimicrobial Photodynamic Treatment. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2009;9:974-983.
17. Maisch T, Hackbarth S, Regensburger J, Felgenträger A, Bäumlner W, Landthaler M et al. Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB)—a new approach to treat superficial infections in the 21st century. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 2011;9:360-366.

18. Araujo N, Fontana C, Gerbi M, Bagnato V. Overall-Mouth Disinfection by Photodynamic Therapy Using Curcumin. *Photomedicine and Laser Surgery* 2012;30:96-101.
19. Mang T, Tayal D, Baier R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. *Lasers in Surgery and Medicine* 2012;44:588-596.
20. Lyon J, Rezende R, Rabelo M, de Lima C, Moreira L. Synergic Effect of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Surfactants in the Inhibition of *Candida albicans*. *Mycopathologia* 2013;175:159-164.
21. Panhóca VH, Geralde MC, Corrêa TQ, Carvalho MT, Souza CWO, Bagnato VS. Enhancement of the Photodynamic Therapy Effect on *Streptococcus Mutans* Biofilm. *Journal of Physical Science and Application* 2014;4:107-114.
22. Nitschke M, Pastore GM. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova* 2002;25:772-776.
23. Fernandes P, de Arruda I, dos Santos A, de Araujo A, Maior A, Ximenes E. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 2007;38:704-709.
24. Mejare I, Axelsson S, Dahlen G, Espelid I, Norlund A, Tranaeus S et al. Caries risk assessment. A systematic review. *Acta Odontologica Scandinavica* 2014;72:81-91.
25. Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J et al. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 1999;50:1-7.
26. Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2005:41-47.

27. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2004;3:412-418.
28. Araújo N, Fontana C, Bagnato V, Gerbi M. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers in medical science* 2014;29:629-635.
29. Paschoal M, Tonon C, Spolidorio D, Bagnato V, Giusti J, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2013;10:313-319.
30. Jones C. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontology* 2000 1997;15:55-62.
31. Pires JR, Rossa Junior C, Pizzolitto AC. In vitro antimicrobial efficiency of a mouthwash containing triclosan/gantrez and sodium bicarbonate. *Brazilian oral research* 2007;21:342-347.

10 DISCUSSÃO

O biofilme dental é constituído por uma microbiota bucal de multi-espécies de micro-organismos, no qual se encontra o agente etiológico *S. mutans* que é o causador de desmineralizações nas superfícies dentais e da cárie dental em indivíduos que não conseguem controlar com higienização adequada a cavidade bucal. A ingestão de alimentos ricos em sacarose pelo indivíduo desenvolve um aumento de espécies de bactérias sacarolíticas e acidogênicas, tais como *S. mutans* e lactobacilos, propiciando um biofilme dental produtor de ácidos que provocam inicialmente a desmineralização dental e, posteriormente, a cárie, e em um estágio mais avançado pode levar o desenvolvimento de doença periodontal. A higiene bucal para evitar o aparecimento de cáries e doenças periodontais pode ser feita através de ação mecânica, tal como escovação dentária, uso de instrumentos profissionais profiláticos entre outros, e por ação química, tal como bochechos com soluções antissépticas ou terapia antibiótica.³⁸

Os acessórios ortodônticos instalados nos dentes de um indivíduo criam novas faces de retenção de microrganismos na cavidade bucal, elevando a formação de biofilme e a população de bactérias bucais no indivíduo. A elevação de *S. mutans* em indivíduos portadores de acessórios ortodônticos em relação a indivíduos não tratados ortodonticamente e também o controle deficiente de higiene dos acessórios ortodônticos por parte do indivíduo fazem ainda elevar mais os níveis de *S. mutans* na cavidade bucal destes indivíduos.¹⁰

A TFDA tem sido aplicada como terapia antitumoral eficaz principalmente em lesões de pele e vários outros estudos vem mostrando seu efeito também como um método fototerápico antimicrobial potente e alternativo.^{39,44} A TFDA age inativando os micro-organismos através da aplicação de fotossensibilizadores (FSs) que concomitantemente a aplicação de luz induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que por um mecanismo de oxirredução destrói os micro-organismos. Muitos estudos recentes vêm mostrando a aplicação da TFDA em odontologia como terapia alternativa antimicrobiana na descontaminação intra-radicular feita em tratamentos endodônticos e em descontaminação de bolsas periodontais.^{45,46} Os micro-organismos bucais apresentam-se na forma de biofilme dental aderidos sobre a superfície dos dentes ou mucosas, esses micro-organismos formam colônias protegidas por uma matriz de polissacarídeos que dificultam a ação antimicrobiana das próprias defesas naturais do indivíduo, da ação de antimicrobianos como soluções para bochecho e também da ação da

TFDA.¹² Encontramos relatos na literatura descrevendo que os micro-organismos presentes em biofilmes apresentam resistência aos agentes antimicrobianos de 10 a até 1000 vezes maior do que quando comparados aos mesmos micro-organismos crescidos de maneira planctônica.⁴⁷ Esta resistência do micro-organismo é propiciada pela estrutura arquitetônica do biofilme impedindo a maior penetração dos antimicrobiais em solução para bochecho através do biofilme para agir sobre as colônias bacterianas dentais. Além disto, estas soluções também apresentam uma desvantagem em relação a TFDA por agirem em apenas um sítio alvo para inativar os micro-organismos, diferentemente da TFDA que age em várias estruturas das organelas das bactérias o que dificilmente produz a formação de micro-organismos resistentes.⁴⁸⁻⁵¹

Diante da resistência microbial em função da estrutura do biofilme os surfactantes surgem como moléculas que podem auxiliar de forma sinérgica ao efeito antimicrobial da TFDA sobre o biofilme formado nas superfícies dentais. Os surfactantes por suas características bioquímicas são altamente emulsificantes e agem como potentes redutores de tensão interfacial e superficial.⁵² Os surfactantes vêm sendo apresentados também como responsáveis pela formação nas membranas bacterianas de canais iônicos através de proteínas transmembranas, semelhantes às porinas, que permitem a passagem de solutos através da membrana, resultando no aumento da permeabilidade destas membranas.^{52,54}

Existem trabalhos anteriores mostrando o efeito da TFDA utilizando curcumina e LED emitindo luz azul com capacidade de reduzir o número viável de *S. mutans* em cultura de células planctônicas.^{24,55,56} Nesta tese foram realizados dois experimentos, um *in vitro* e outro *in vivo* para avaliar o efeito fotodinâmica da ação da Curcumina diluída com surfactante sobre o *S mutans* presente na cavidade bucal. No estudo *in vitro* foi realizado aplicação de TFDA para avaliar a susceptibilidade de *S mutans* em biofilme formado na superfície metálica de acessórios ortodônticos. As amostras obtidas a partir de lâminas de bandas ortodônticos (NiCr) , foram utilizados como superfície de adesão para o biofilme . As amostras contendo biofilme foram tratadas com 1 g/mL de Curcumina, com 0,1% de dodecil sulfato de sódio e expostas a 30J/cm² de luz (455nm). Os resultados mostraram que o grupo que foi aplicado TFDA usando Curcumina diluída em surfactante apresentaram uma redução significativa(p<0,001) de 99,999% na população viável de *S mutans*. No estudo *in vivo* foi utilizado TFDA associando Curcumina diluída em surfactante nas mesmas concentrações que o estudo *in vitro*, aplicando-se luz azul emitida por LED durante 3 minutos em irradiação intra-bucal e durante mais 3 minutos frontalmente as arcadas superior e inferior obtendo resultados que se mostraram

eficazes e estatisticamente significativo como antimicrobial bucal quando comparado ao grupo controle negativo (C-) e demais grupos experimentais, exceto o grupo controle positivo, que fizeram bochecho por 30 segundos com clorexidina a 0,12%. Os resultados encontrados em nossos experimentos do efeito fotodinâmico na inibição de *S. mutans* corroboram com os achados encontrados nos trabalhos de Araújo et al (2012), Mang et al (2012) e Paschoal et al (2013).

Os experimentos de Araújo et al (2012) apresentaram sinergismo de efeito na aplicação de luz azul com intensidade de 20,1J/cm² e Curcumina com concentração de 1,5g/L, confirmando o efeito da terapia fotodinâmica inativando 68,3% de bactérias, ao passo que no grupo com os mesmos voluntários que foi tratado apenas com Curcumina o efeito da droga não resultou numa redução efetiva de micro-organismos.⁵⁵ Nos estudos de Mang et al (2012) aplicando TFD com Photofrin na concentração de 2,5g/L e luz vermelha com intensidade de 100mW/cm² a TFD mostrou ser um tratamento seguro e eficaz para inativação de *S. mutans* em biofilme na cavidade bucal mostrando ser um adjuvante nos tratamentos mecânico e antibiótico atualmente utilizados.⁵⁷ Paschoal et al (2013) mostraram em seus estudos a redução significativa da viabilidade de *S. mutans* com a associação de 4000 µM de Curcumina e aplicação de luz azul com intensidades de 48 e 72 J/cm², promovendo a redução microbiana em 60,66% e 71,07%, respectivamente.²⁴

Idealmente, um amplo espectro de ação antimicrobiana deve ser alcançado com um determinado protocolo de TFDA. Resultados em estudos experimentais devem ser considerados como eficazes na inativação antimicrobial quando apresentam eliminação bacteriana $\geq 3 \log_{10}$, ou seja, \geq redução de 99,9% dos microrganismos viáveis.⁵⁸ O estudo *in vitro*, mostrou que a TFDA usando Curcumina associado ao surfactante foi eficaz na inativação de *S. mutans* em biofilme, pois apresentou uma redução de 99,999% (UFC/ml) em comparação com o grupo controle. Os resultados obtidos no trabalho *in vivo* mostram que a Curcumina isolada e a aplicação de apenas luz como terapia antimicrobial bucal não apresentaram eficácia na inativação de *S. mutans*, pois apresentaram pequena diminuição da população bacteriana de 1,74% e 6,42%, respectivamente. Assim como, não ocorreu eficácia terapêutica quando se aplicou Curcumina e surfactante, pois apresentaram redução de 12,65%. Quando comparamos no estudo *in vivo* a eficácia da clorexidina a 0,12% com a TFDS, podemos observar que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre esses grupos, sendo redução de 57,71% de redução de *S. mutans* para a terapia com clorexidina 0,12% e 29,35% após terapia com

TFDS. Podemos considerar diante destes resultados que a TFDS surge como uma terapia potencial antimicrobiana bucal para inativação de *S. mutans*.

A clorexidina 0,12% em solução é um anti-séptico bucal químico, com ação antifúngica e bactericida, capaz de eliminar tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, muito utilizado nessa concentração em tratamentos periodontais em odontologia após raspagem periodontal para inativação microbiana bucal e considerado como padrão ouro em terapia antimicrobial periodontal.^{37,59} A clorexidina apresenta efeitos colaterais como mudança de paladar e coloração dental após uso contínuo o que motiva no presente momento novas pesquisas na busca por um antimicrobiano bucal tão eficaz e alternativo em odontologia, semelhante ao encontrado com a aplicação de TFDA neste experimento.⁶⁰

No experimento *in vitro*, observou-se que ocorre de fato efeito da TFDA no biofilme formado por *S mutans*. Pode-se observar também que somente luz não causa modificação na taxa de sobrevivência bacteriana, a TFDA modifica este quadro promovendo decréscimo de quase duas unidades logarítmicas de UFC/mL. Aplicação sozinha de luz sobre o biofilme formado em superfície metálica neste estudo chega a promover pequeno estímulo de crescimento microbial, provavelmente devido a leve bioestimulação levando a alteração de temperatura e facilidade de transporte de nutrientes neste meio. Este efeito, no entanto é considerado insignificante no sentido de promover qualquer aplicação de luz no intervalo visível em técnicas de controle microbial. A diminuição de quase duas unidades logarítmicas com TFDA neste estudo é marginal no uso como técnica para eliminação ou diminuição microbiana. Esta ação marginal da TFDA ocorre em razão que os biofilmes são estruturados de maneira que tornam difícil a conjugação junto aos micro-organismos dos ingredientes necessários a TFDA. A baixa penetrabilidade do FS, pouca difusão de oxigênio e barreira natural à penetração da luz, torna pouco eficiente a ação da TFDA quando comparado com equivalentes trabalhos experimentais planctônicos.

De maneira geral, uma diminuição de 3 a 4 unidades em escala logarítmicas em variação são observadas quando comparamos redução microbial nos estudos realizados em micro-organismos presentes em biofilmes e em solução (estado planctônico). Portanto, para tornar a ação da TFDA mais eficiente, torna-se necessário adicionar efeitos extras que permitam possibilitar aumento da eficiência da mesma. Vários elementos poderiam auxiliar na quebra ou diminuição das barreiras oferecidas pelo biofilme dental à ação da TFDA, tal como, efeito mecânico com uso de ultrassom que permitiria melhoria desta eficiência realizado em terapias

periodontais.⁶⁴ Uma outra possibilidade, é o uso de adições químicas, que não causam danos aos tecidos bucais, que permitam agir potencializando o efeito da TFDA. Os surfactantes são substâncias de amplo uso comercial em bochechos antimicrobianos bucais e por este motivo foram escolhidos como possível coadjuvante na ação da TFDA em biofilme dental. Os surfactantes mostram um aumento potencial da TFDA na inativação microbiana bucal suscitando a hipótese que o efeito do surfactante ocorra devido a formação de canais iônicos nas membranas bacterianas o que permitem a passagem de solutos através desta, resultando no aumento da permeabilidade destas membranas permitindo que as moléculas de FS atinja as organelas intra-celulares bacterianas e quando combinado a irradiação com luz ocorre oxidação das estruturas celulares microbianas e promovem a sua morte.¹⁴

No estudo *in vitro*, pode-se observar que o grupo tratado apenas com surfactante apresenta descontaminação equivalente ao resultado mostrado quando é realizado TFDA apenas. Porém, a ação combinada do surfactante com TFDA supera as suas ações individuais, mostrando-se portanto um agente viável para potencialização da TFDA contra microorganismos presentes em biofilme dental. Este efeito não é apenas aditivo, mas sim sinérgico, ocorre ação do surfactante auxiliando a diminuição de barreiras naturalmente encontradas pela TFDA. Os surfactantes podem agir não só nas membranas microbianas, mais também nas moléculas de FS e alteração do biofilme. Nas moléculas, pode ocorrer blindagem molecular evitando a formação de aglomerados moleculares, facilitando desta forma a penetração do FS no biofilme. Os surfactantes podem também permitir mais eficiência na transferência de energia para o oxigênio na produção de EROs.

Os resultados obtidos com a conjugação de surfactante e TFDA no estudo *in vitro* mostra diminuição de aproximadamente 6 unidades em escala logarítmica em UFC validando a grande potencialidade do uso de TFDA contra *S mutans* em biofilme dental, tirando da região marginal a ação isolada da TFDA. O aumento considerável do rendimento com o uso conjugado da TFDA mais o surfactante, torna a técnica viável para esta finalidade. Baseado nos resultados deste experimento *in vitro* obtivemos subsídios para realização dos ensaios clínicos com cuidados na extrapolação desses resultados. Apesar dos ensaios *in vitro* funcionarem como um guia, eles não podem ser diretamente extrapolados para a ação clínica.

Os resultados do experimento *in vivo* foram obtidos usando como base para utilização a dose de aplicação de luz, concentração de FS e surfactante de maneira semelhante aos ensaios *in vitro*. A ação da TFDA sozinha ou combinada com surfactante no estudo *in vivo* não alcança

a eficiência obtida no caso *in vitro*. A presença de novos fatores, tais como, constante fluxo salivar que pode impedir a fixação do FS nos micro-organismos presentes em biofilme nas superfícies dental e metálica do aparelho ortodôntico. Outros efeitos adversos são esperados e também podem agir de maneira negativa para eficiência da ação da TFDA no meio intra-bucal. Nossa hipótese, é que estes efeitos sejam fatores preponderantes na diminuição de 1 unidade em escala logarítmica da ação da TFDA do estudo *in vitro* para o experimento *in vivo*. Os resultados, mostram que o uso conjugado de TFDA mais surfactante mostraram diferenças significativas quando comparadas com o uso individual de cada um destes agentes no estudo *in vitro* e *in vivo*. No estudo *in vivo* se obteve menos de 1 unidade na escala logarítmica de diminuição com a aplicação de TFDA mais surfactante, quase insignificante com o resultado de diminuição em 5,6 unidade na escala logarítmica observado no experimento *in vitro*. Isto, no entanto, não deve ser alarmante já que, mesmo o uso de substâncias antimicrobianas consideradas padrão ouro em descontaminação bucal, como a clorexidina, apresentaram redução microbiana em escala logarítmica menor que 1 unidade em escala logarítmica e sem diferença estatística significativa do resultado obtido com TFDA mais surfactante no estudo *in vivo*. Estes resultados demonstram que a TFDA amplificada (com surfactante) pode ser uma alternativa segura para controle microbiano bucal durante tratamento ortodôntico.

Os efeitos antimicrobiais da TFDA amplificada podem ser usados em concomitância com as terapias tradicionais de controle de biofilme dental não só em indivíduos ortodônticos que apresentam dificuldade em higiene bucal mais também em indivíduos em ambientes hospitalares ou especiais que também apresentam limitação em realizar uma adequada higienização da cavidade bucal.

Além disso, a ação da TFDA amplificada usando Curcumina é totalmente localizada, sem efeito em caso de ingestão excessiva do FS e sua eliminação não causa risco ao meio ambiente por ser biodegradável. Sabe-se no entanto que o potencial da TFDA pode ser muito maior que aqui demonstrado, significando que mais estudos com introdução de novos fatores que permitam minimizar barreiras existentes podem promover um considerável avanço da TFDA para superar em muito a ação da clorexidina que certamente já atingiu seu potencial máximo e possui também efeitos colaterais terapêuticos indesejáveis. A possibilidade de melhoria da técnica torna motivadora a continuidade de trabalhos nesta linha de pesquisa.

11 CONCLUSÃO

Concluindo, a TFDA utilizando curcumina e irradiação com LED azul, quando aplicada na superfície metálica de acessórios ortodônticos para inativação de *S. mutans* provou reduzir a população destes micro-organismos nos experimentos *in vivo* e *in vitro*. Os melhores resultados para inativação de *S. mutans* nos experimentos *in vivo* e *in vitro* foram obtidos com a associação de luz e curcumina diluída em surfactante (TFDS), exceto quando comparado a terapia com clorexidina a 0,12% no estudo *in vivo*. Novos estudos devem investigar os efeitos de diferentes parâmetros de irradiação com LED, diferentes concentrações de FS e surfactante para melhorar a eficácia da TFDA como antimicrobiano bucal.

REFERÊNCIAS

1. CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4130309/>>. Acesso: 01 dez. 2014.
2. MANOIL, Daniel et al. Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 11, n. 3, p. 372-379, 2014. Disponível em: <[http://www.pdpdt-journal.com/article/S1572-1000\(14\)00089-1/abstract](http://www.pdpdt-journal.com/article/S1572-1000(14)00089-1/abstract)>. Acesso: 01 dez. 2014.
3. HAYASAKI, H. et al. Tooth brushing for oral prophylaxis. **Japanese Dental Science Review**, v. 50, n. 3, p. 69-77, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1882761614000180>>. Acesso: 01 dez. 2014.
4. GAGARI, E.; KABANI, S. Adverse effects of mouthwash use: a review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 80, n. 4, p. 432-439, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210405803373>>. Acesso: 01 dez. 2014.
5. MOAN, J. et al. Hematoporphyrin derivative: chemical composition, photochemical and photosensitizing properties. In: KESSEL, D. (Org.). **Porphyrin photosensitization: advances in experimental medicine and biology**. New York: Springer, 1983. p. 165-179.
6. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/42/1/13.short>>. Acesso: 01 dez. 2014.
7. DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Archives of Oral Biology**, v. 37, n. 11, p. 883-887, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1334649>>. Acesso: 01 dez. 2014.
8. GIUSTI, J. et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. **Photomedicine and laser surgery**, v. 26, n. 4, p. 281-287, 2008. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/pho.2007.2149>>. Acesso: 01 dez. 2014.
9. KROGMAN, W. M. Early man: by F Clark Howell and the editors of Life. **American Journal of Physical Anthropology**, New York, v. 23, n. 4, p. 445, 1965.
10. CORBETT, J. A. et al. Comparison of *Streptococcus mutans* concentrations in non-banded and banded orthodontic patients. **Journal of Dental Research**, v. 60, n. 12, p. 1936-1942, 1981. Disponível em: <<http://jdr.sagepub.com/content/60/12/1936.short>>. Acesso: 01 dez. 2014.
11. FREITAS, A. O. A. et al. The influence of orthodontic fixed appliances on the oral microbiota: a systematic review. **Dental press journal of orthodontics**, v. 19, n. 2, p. 46-55,

2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S2176-94512014000200046&script=sci_arttext&tlng=es>. Acesso: 01 dez. 2014.
12. FONTANA, C. R. et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **Journal of periodontal research**, v. 44, n. 6, p. 751-759, 2009. Disponível em: <<http://europepmc.org/articles/pmc2784141>>. Acesso: 01 dez. 2014.
13. GIROLDO, L. M. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. **Lasers in medical science**, v. 24, n. 1, p. 109-112, 2009. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/profile/Egberto_Munin/publication/226817550_Photodynamic_antimicrobial_chemotherapy_\(PACT\)_with_methylene_blue_increases_membrane_permeability_in_Candida_albicans/links/0d1c84f9026c25cb32000000.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Egberto_Munin/publication/226817550_Photodynamic_antimicrobial_chemotherapy_(PACT)_with_methylene_blue_increases_membrane_permeability_in_Candida_albicans/links/0d1c84f9026c25cb32000000.pdf)>. Acesso: 01 dez. 2014.
14. LYON, J. P. et al. Synergic effect of photodynamic therapy with methylene blue and surfactants in the inhibition of *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 175, n. 1-2, p. 159-164, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23187768>>. Acesso: 01 dez. 2014.
15. KOKICH, V. What's new in dentistry. **The Angle Orthodontist**, v. 79, n. 6, p.1019-1020, 2009. Disponível em: <<http://www.angle.org/doi/full/10.2319/0003-3219-079.006.1019>>. Acesso: 01 dez. 2014.
16. KIM, S. H. et al. Microbiologic changes in subgingival plaque before and during the early period of orthodontic treatment. **The Angle Orthodontist**, v. 82, n. 2, p. 254-260, 2011. Disponível em: <<http://www.angle.org/doi/abs/10.2319/030311-156.1>>. Acesso: 01 dez. 2014.
17. KÖHLER, B. et al. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. **European journal of oral sciences**, v. 111, n. 5, p. 383-389, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0722.2003.00068.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>>. Acesso: 01 dez. 2014.
18. MARSH, P. D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. s6, p. 7-15, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-051X.2005.00790.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>>. Acesso: 01 dez. 2014.
19. LI, Y. H. et al. Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 22, p. 6333-6342, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC151940/>>. Acesso: 01 dez. 2014.
20. KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 3, p. 389-413, 2000.

Disponível em: <[http://www.jaad.org/article/S0190-9622\(00\)90209-3/fulltext](http://www.jaad.org/article/S0190-9622(00)90209-3/fulltext)>. Acesso: 01 dez. 2014.

21. DAI, T.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections—state of the art. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 6, n. 3, p. 170-188, 2009. Disponível em: <<http://europepmc.org/articles/pmc2811240>>. Acesso: 01 dez. 2014.

22. MAISCH, T. et al. Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB): a new approach to treat superficial infections in the 21st century. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 9, n. 5, p. 360-366, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1610-0387.2010.07577.x/full>>. Acesso: 01 dez. 2014.

23. PHILIPPE BIDAULT, D. C. D.; CHANDAD, F.; GRENIER, D. Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 73, n. 8, 2007. Disponível em: <<http://www.cda-adc.ca/jcda/vol-73/issue-8/721.pdf>>. Acesso: 01 dez. 2014.

24. PASCHOAL, M. A. et al. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 10, n. 3, p. 313-319, 2013. Disponível em: <[http://www.pdpdt-journal.com/article/S1572-1000\(13\)00013-6/abstract](http://www.pdpdt-journal.com/article/S1572-1000(13)00013-6/abstract)>. Acesso: 01 dez. 2014.

25. PANHÓCA, V. H. et al. Enhancement of the photodynamic therapy effects on *Streptococcus Mutans* biofilm. **Journal of Physical Science and Application**, v. 4, p. 107-114, 2014. Disponível em: <<http://www.davidpublishing.com/davidpublishing/Upfile/5/12/2014/2014051281098641.pdf>>. Acesso: 01 dez. 2014.

26. WIKENE, K. O. et al. Formulation and characterization of lyophilized curcumin solid dispersions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): studies on curcumin and curcuminoids LII. **Drug development and industrial pharmacy**, n. 0, p. 1-9, 2014. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/03639045.2014.919315>>. Acesso: 01 dez. 2014.

27. JIANG, Y. et al. Photodynamic action of LED-activated curcumin against *Staphylococcus aureus* involving intracellular ROS increase and membrane damage. **International Journal of Photoenergy**, v. 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijp/2014/637601/abs/>>. Acesso: 01 dez. 2014.

28. ARAÚJO, N. C. et al. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. **Lasers in medical science**, v. 29, n. 2, p. 629-635, 2014. Disponível em: <http://www.researchgate.net/profile/Carla_Fontana3/publication/241693641_Photodynamic_antimicrobial_therapy_of_curcumin_in_biofilms_and_carious_dentine/links/5421690a0cf203f155c66c2e.pdf>. Acesso: 01 dez. 2014.

29. SCHMIDT, M. H. et al. Light-emitting diodes as a light source for intraoperative photodynamic therapy. **Neurosurgery**, v. 38, n. 3, p. 552-557, 1996. Disponível em: <<http://content.lib.utah.edu/utis/getfile/collection/uspace/id/252/filename/2998.pdf>>. Acesso: 01 dez. 2014.
30. TESSAROLLI, Vanessa. **Ação da terapia fotodinâmica (TFD) sobre o biofilme dentário humano**. 2010. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25145/tde-28072011-102549/>>. Acesso: 01 dez. 2014.
31. ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry: should they be a concern?. **International journal of food microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125-148, 1994. Disponível em: <<http://europemc.org/abstract/med/7848776>>. Acesso: 01 dez. 2014.
32. KÖNIG, J. et al. Anti-plaque effect of tempered 0.2% chlorhexidine rinse: an in vivo study. **Journal of clinical periodontology**, v. 29, n. 3, p. 207-210, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-051x.2002.290304.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>>. Acesso: 01 dez. 2014.
33. ROSE, F. L.; SWAIN, G. 850 bisdiguânes having antibacterial activity. **Journal of the Chemical Society**, p. 4422-4425, 1956. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1956/jr/jr9560004422#!divAbstract>>. Acesso: 01 dez. 2014.
34. LÖE, H.; RINDOM SCHIØTT, C. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **Journal of Periodontal Research**, v. 5, n. 2, p. 79-83, 1970. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0765.1970.tb00696.x/abstract>>. Acesso: 01 dez. 2014.
35. CHEMICALS, Pharmacia Fine. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. **Journal of Dental Research**, v. 54, p. B57, 1975. Disponível em: <http://www.researchgate.net/profile/Birte_Melsen2/publication/22900525_On_the_mechanism_of_the_plaque_inhibition_by_chlorhexidine/links/0c960528785a411155000000.pdf>. Acesso: 01 dez. 2014.
36. GJERMO, P.; BONESVOLL, P.; RÖLLA, G. Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. **Archives of Oral Biology**, v. 19, n. 11, p. 1031-1034, 1974. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003996974900909>>. Acesso: 01 dez. 2014.
37. KAUR, H.; JAIN, S.; KAUR, A. Comparative evaluation of the antiplaque effectiveness of green tea catechin mouthwash with chlorhexidine gluconate. **Journal of Indian Society of**

- Periodontology**, v. 18, n. 2, p. 178, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4033883/>>. Acesso: 01 dez. 2014.
38. SANTAMARIA, M. et al. Antimicrobial effect of Melaleuca alternifolia dental gel in orthodontic patients. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 145, n. 2, p. 198-202, 2014. Disponível em: <[http://www.ajodo.org/article/S0889-5406\(13\)00964-5/abstract](http://www.ajodo.org/article/S0889-5406(13)00964-5/abstract)>. Acesso: 01 dez. 2014.
39. HAUKVIK, T. et al. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations: studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 10, p. 666-673, 2009. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/govi/pharmaz/2009/00000064/00000010/art00009>>. Acesso: 01 dez. 2014.
40. MUKHOPADHYAY, A. et al. Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats. **Agents and Actions**, v. 12, n. 4, p. 508-515, 1982. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/7180736>>. Acesso: 01 dez. 2014.
41. SRIMAL, R. C.; DHAWAN, B. N. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent*. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 25, n. 6, p. 447-452, 1973. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-7158.1973.tb09131.x/abstract>>. Acesso: 01 dez. 2014.
42. RAO, T. S. et al. Anti-inflammatory activity of curcumin analogues. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 137, n. 4, p. 841, 2013. Disponível em: <http://icmr.nic.in/ijmr/2013/april/most_cited1.pdf>. Acesso: 01 dez. 2014.
43. LEU, T. H.; MAA, M. C. The molecular mechanisms for the antitumorigenic effect of curcumin. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 2, n. 3, p. 357-370, 2002. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/12678737>>. Acesso: 01 dez. 2014.
44. WOO, J. H. et al. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 7, p. 1199-1208, 2003. Disponível em: <<http://carcin.oxfordjournals.org/content/24/7/1199.short>>. Acesso: 01 dez. 2014.
45. SIDDIQUI, S. H.; AWAN, K. H.; JAVED, F. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against Enterococcus faecalis in infected root canals: a systematic literature review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 4, p. 632-643, 2013. Disponível em: <[http://www.pdpdt-journal.com/article/S1572-1000\(13\)00093-8/fulltext](http://www.pdpdt-journal.com/article/S1572-1000(13)00093-8/fulltext)>. Acesso: 01 dez. 2014.
46. POURABBAS, R. et al. Effects of photodynamic therapy on the clinical and gingival crevicular fluid inflammatory biomarkers in chronic periodontitis: a split-mouth randomized clinical trial. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 9, p. 1-11, 2014. Disponível em: <<http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2014.130464>>. Acesso: 01 dez. 2014.

47. SEDLACEK, M. J.; WALKER, C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, n. 5, p. 333-339, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2040071/>>. Acesso: 01 dez. 2014.
48. JORI, G. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers in surgery and medicine**, v. 38, n. 5, p. 468-481, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lsm.20361/abstract>>. Acesso: 01 dez. 2014.
49. LAURO, F. M. et al. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene–polylysine conjugates. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 7, p. 468-470, 2002. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/12659156>>. Acesso: 01 dez. 2014.
50. TAVARES, A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. **Marine drugs**, v. 8, n. 1, p. 91-105, 2010. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/8/1/91/htm>>. Acesso: 01 dez. 2014.
51. PAULINO, T. P. et al. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 3, p. 353-359, 2005. Disponível em: <[http://www.aobjournal.com/article/S0003-9969\(04\)00204-3/fulltext](http://www.aobjournal.com/article/S0003-9969(04)00204-3/fulltext)>. Acesso: 01 dez. 2014.
52. FERNANDES, P. A. V. et al. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 704-709, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822007000400022&script=sci_arttext>. Acesso: 01 dez. 2014.
53. PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 5, p. 553-563, 1999. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/10390813>>. Acesso: 01 dez. 2014.
54. NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n5/11408.pdf>>. Acesso: 01 dez. 2014.
55. ARAUJO, N. C. et al. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. **Photomedicine and laser surgery**, v. 30, n. 2, p. 96-101, 2012. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/pho.2011.3053>>. Acesso: 01 dez. 2014.
56. PASCHOAL, M. A. et al. *Streptococcus mutans* photoinactivation by combination of short exposure of a broad-spectrum visible light and low concentrations of photosensitizers. **Photomedicine and laser surgery**, v. 32, n. 3, p. 175-180, 2014. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/pho.2013.3656>>. Acesso: 01 dez. 2014.

57. MANG, T. S.; TAYAL, D. P.; BAIER, R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. **Lasers in surgery and medicine**, v. 44, n. 7, p. 588-596, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lsm.22050/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>>. Acesso: 01 dez. 2014.
58. KIESSLICH, T. et al. A comprehensive tutorial on in vitro characterization of new photosensitizers for photodynamic antitumor therapy and photodynamic inactivation of microorganisms. **BioMed research international**, v. 2013, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/840417/>>. Acesso: 01 dez. 2014.
59. JONES, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard?. **Periodontology 2000**, v. 15, n. 1, p. 55-62, 1997. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00105.x/abstract>>. Acesso: 01 dez. 2014.
60. LORENZ, K. et al. Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque, gingivitis, and discolouration: a randomized, investigator-blind, placebo-controlled, 3-week experimental gingivitis study. **Journal of clinical periodontology**, v. 33, n. 8, p. 561-567, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-051X.2006.00946.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>>. Acesso: 01 dez. 2014.
61. ALZATE CEBALLOS, J. A. et al. Obtención del complejo ciclodextrina-curcumina y su uso como reemplazante de tartrazina. **Revista Lasallista de Investigación**, v. 9, n. 2, 2012, p. 75, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-44492012000200009&script=sci_arttext>. Acesso: 01 dez. 2014.
62. CENTRO DE REFERÊNCIA VIRTUAL DO PROFESSOR. **O efeito estufa e a temperatura da terra**. 2010. Disponível em: <http://crv.educacao.mg.gov.br/sistema_crv/index.aspx?ID_OBJETO=121124&tipo=ob&cp=003366&cb=&n1=&n2=M%EF%BF%BDdulos%20Did%EF%BF%BDticos&n3=Tem%EF%BF%BDticas%20Especiais%20%20Educa%C3%A7%C3%A3o%20Ambiental&n4=&b=s>. Acesso: 01 dez. 2014.
63. MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. **Química Nova**, v. 23, n. 5, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422000000500018>. Acesso: 01 dez. 2014.
64. GIUSTI, J. S. M. et al. Single equipment combines simultaneous application of mechanical ultrasound and photodynamic action for microbial control. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 7, n. 2, p. 137-138, 2010.

APÊNDICE A**RELATÓRIO****AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE LUZ NA CANETA 5 LEDs em 450nm**

Pesquisador responsável LAT: Jefferson Wanderson Rossi Tinta

Pesquisador responsável Biofotônica: Priscila Menezes

Pesquisador responsável: Vitor Hugo Panhóca

Data: 26 de junho de 2013

INTRODUÇÃO

Com a utilização de uma caneta contendo um led, com potência inferior a 13mW, observou-se que era necessário um tempo muito alto para realização da descontaminação bucal. Com isso se deu a necessidade do desenvolvimento de um novo protótipo que apresentasse uma potência superior a 13mW, diminuindo portanto o tempo da utilização do equipamento na descontaminação bucal.

OBJETIVO

Desenvolver uma caneta (Figura 1) que apresente uma potência acima de 13 mW com o led rebel de 450nm (pedido de patente RUSP nº 2014.1.242.76.0).

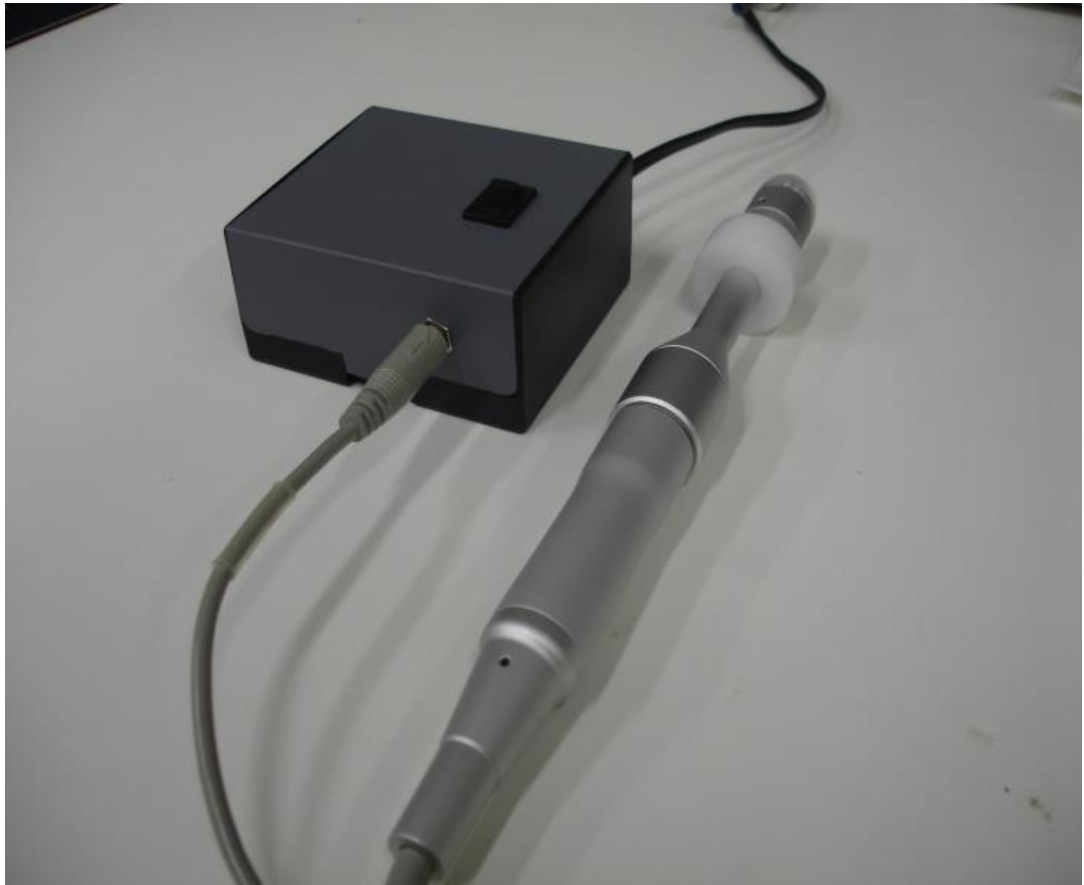
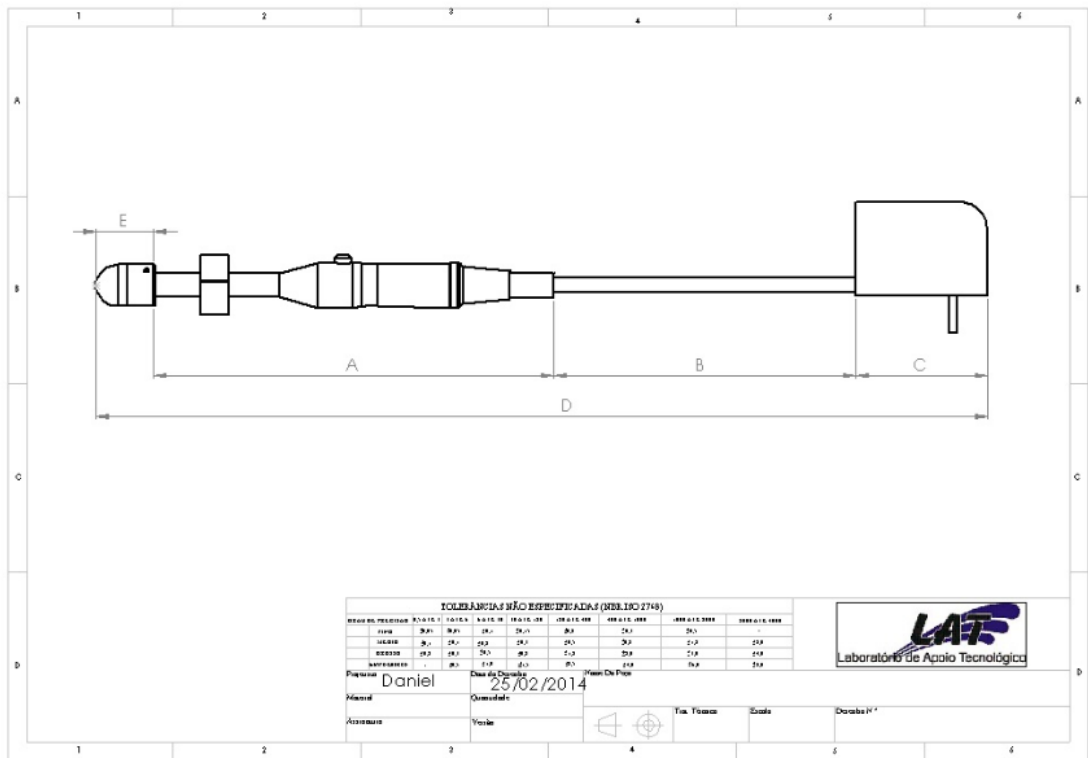
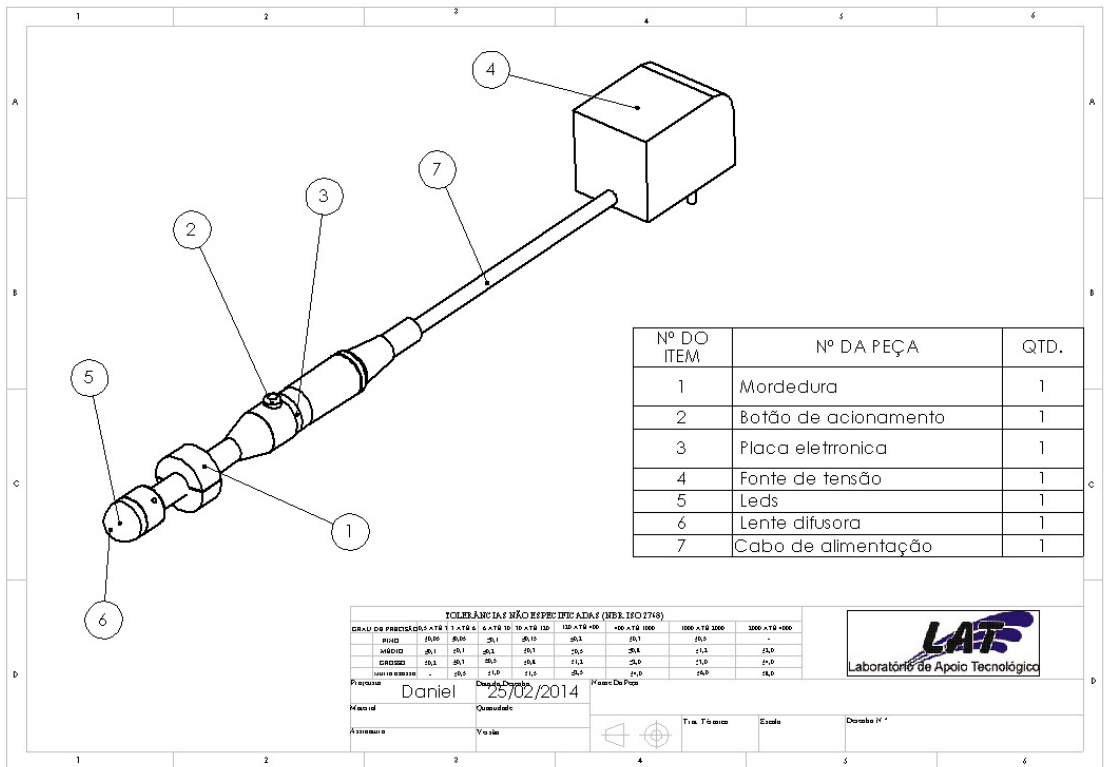
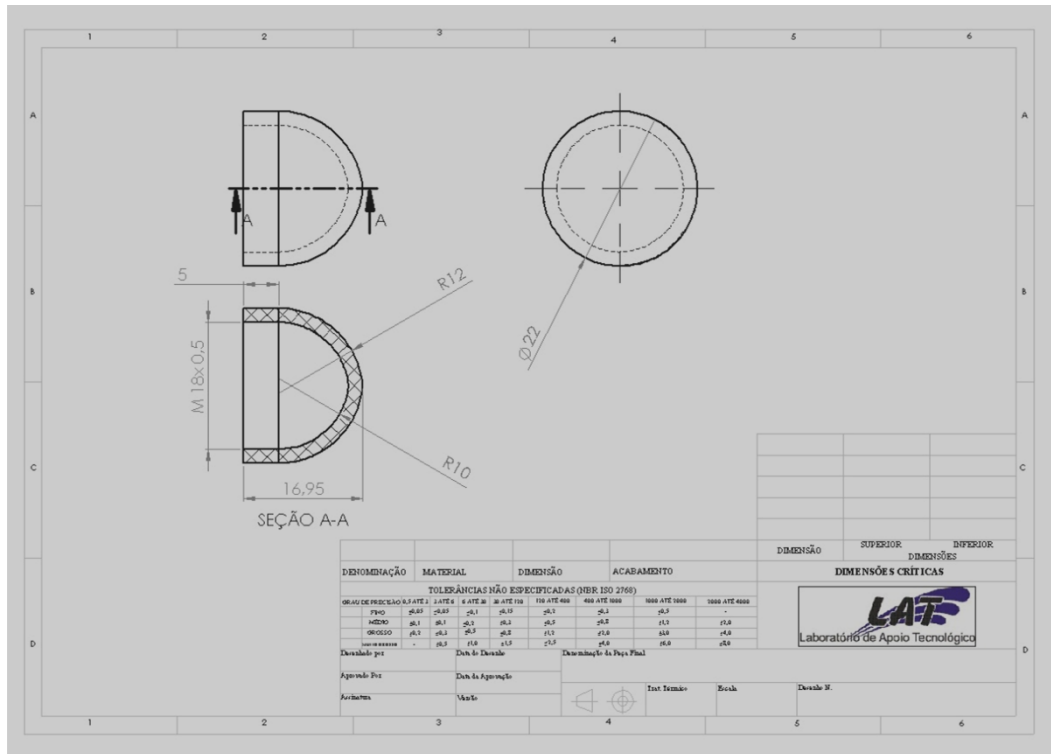


Figura 1 - Imagem da caneta 5 leds ($\lambda = 450 \text{ nm}$)

DESENHO TÉCNICO – DIMENSÕES





CONSIDERAÇÕES

A medida de potência e intensidade que chega a boca é estimada baseando-se na medida de potência com o Power meter.

RESULTADOS

AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA

A Avaliação do comprimento de onda foi realizada com espectrômetro de fibra, modelo USB2000 fabricado pela Ocean Optics. Conforme Figura 2 o comprimento de onda é de 451nm.

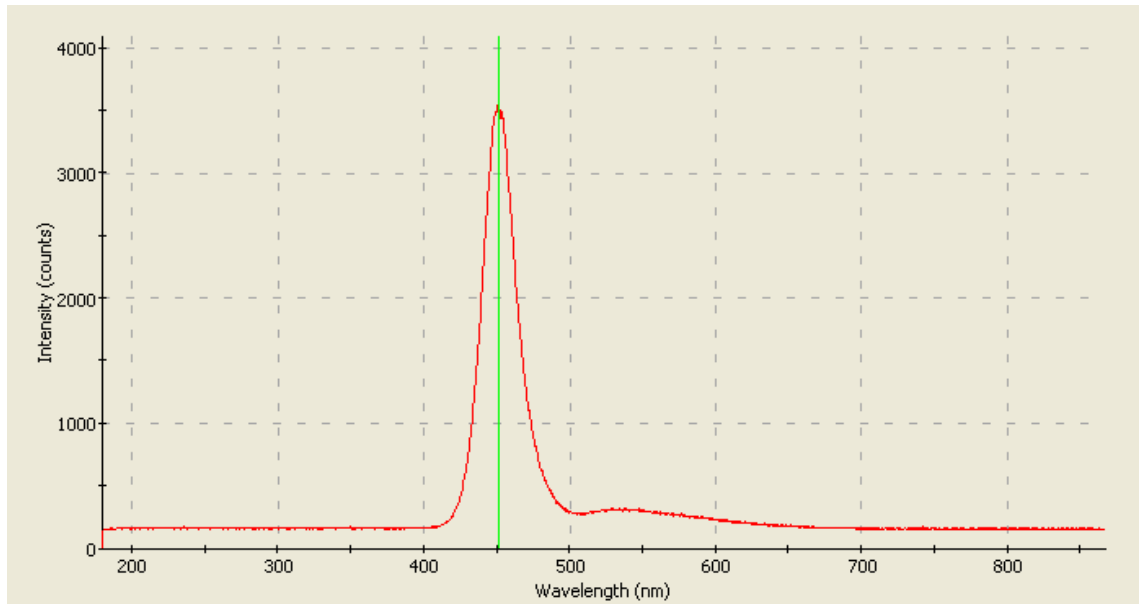


Figura 11 - Medida do comprimento de onda

AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA ÓTICA

A avaliação da potência foi realizada com Power Meter, modelo LabMax_TOP fabricado pela Coherent, e o sensor LM-10HTD, que mede comprimento de onda de 266nm até 10600um, com área de 2,83 cm². O erro estimado para estas medidas é de $\pm 10\%$.

Os seguintes passos foram adotados para realizar a medida de potência:

1. Com o Power Meter ligado, ajustou-se o comprimento de onda para 450 nm;
2. A caneta 5 leds foi encostada no sensor LM-10HTD;
3. Após encostada a caneta, offset do Power Meter foi zerado;
4. Ligou-se a caneta e verificou a potência de 3W em contato com o medidor (Figura 3).



Figura 12 - Medida de potência com a caneta encostada no sensor

AVALIAÇÃO DE INTENSIDADE LUMINOSA NA BOCA

A intensidade de iluminação da boca foi obtida dividindo-se a potência obtida pelo Power Meter pela área da semi esfera da boca. Considerando o raio da boca em 2 cm e a área da boca como uma meia esfera, obtivemos a área de 25,133 cm². Realizando o cálculo da intensidade (P/A) obtivemos a intensidade de luz de 119,36 mw/ cm².

AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA DISSIPADA DA CANETA

Para verificar a temperatura dissipada pela caneta foi utilizado o multímetro FLUKE modelo 289 e um termopar.

O termopar foi encostado na caneta e após 3 minutos verificou-se a temperatura de 40°C (Figura 4). Esta temperatura não leva a queimaduras na mucosa da boca. Esta medida de temperatura foi realizada para avaliar se a temperatura do equipamento poderia elevar-se muito a ponto de queimar a mucosa.

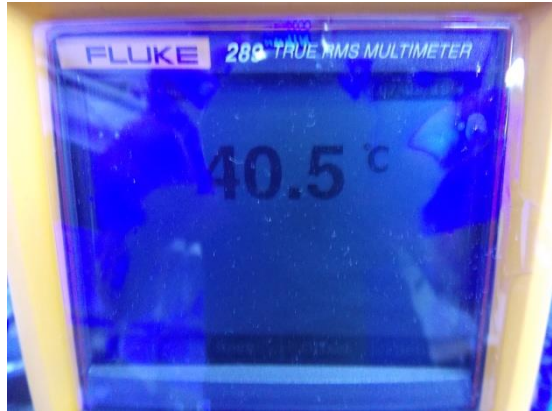


Figura 13 - Temperatura dissipada da caneta

AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA NA BOCA

A caneta foi ligada dentro da boca (Figura 5), após 3 minutos ela foi retirada para verificar a temperatura dentro da boca (Figura 6).



Figura 14 - Caneta ligada dentro da boca

Após a retirada da caneta da boca verificou-se a temperatura interna dessa. Para realização da medida de temperatura interna da boca foi utilizado o termômetro infravermelho da INSTRUTHERM modelo TI-870 que obteve a temperatura interna da boca de 37°C.



Figura 15 Medida de temperatura interna da boca

Considerando a temperatura corpórea de 32 a 36°C verificou-se que não ocorreu um aumento da temperatura. Aumentos acima de 5° C levam a prejuízos nas estruturas dos dentes (necrose).

5. CONCLUSÃO

O protótipo desenvolvido apresentou-se elevada intensidade considerando a área da boca de 25,133 cm² e não apresentou aumento de temperatura relevante sendo considerado portanto seguro.

Quanto a sua efetividade na descontaminação bucal acreditamos que conseguiremos uma diminuição na quantidade de bactérias visto que a intensidade de iluminação aumentou em torno de 230 vezes na área da boca.

APÊNDICE B

RELATÓRIO

**AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE LUZ EM UM EQUIPAMENTO DE
DESCONTAMINAÇÃO BUCAL**

Pesquisador responsável LAT: Guilherme Ferraz Ribeiro

Pesquisador responsável Biofotônica: Priscila Menezes

Pesquisador responsável: Vitor Hugo Panhóca

Data: 24 de Outubro de 2013

1. OBJETIVO

Avaliar a intensidade luminosa em um equipamento de descontaminação bucal que possui comprimento de onda no 450nm.

2. CONSIDERAÇÕES

A medida de potência e intensidade é estimada baseando-se medida de potência com o Power meter.

3. RESULTADOS

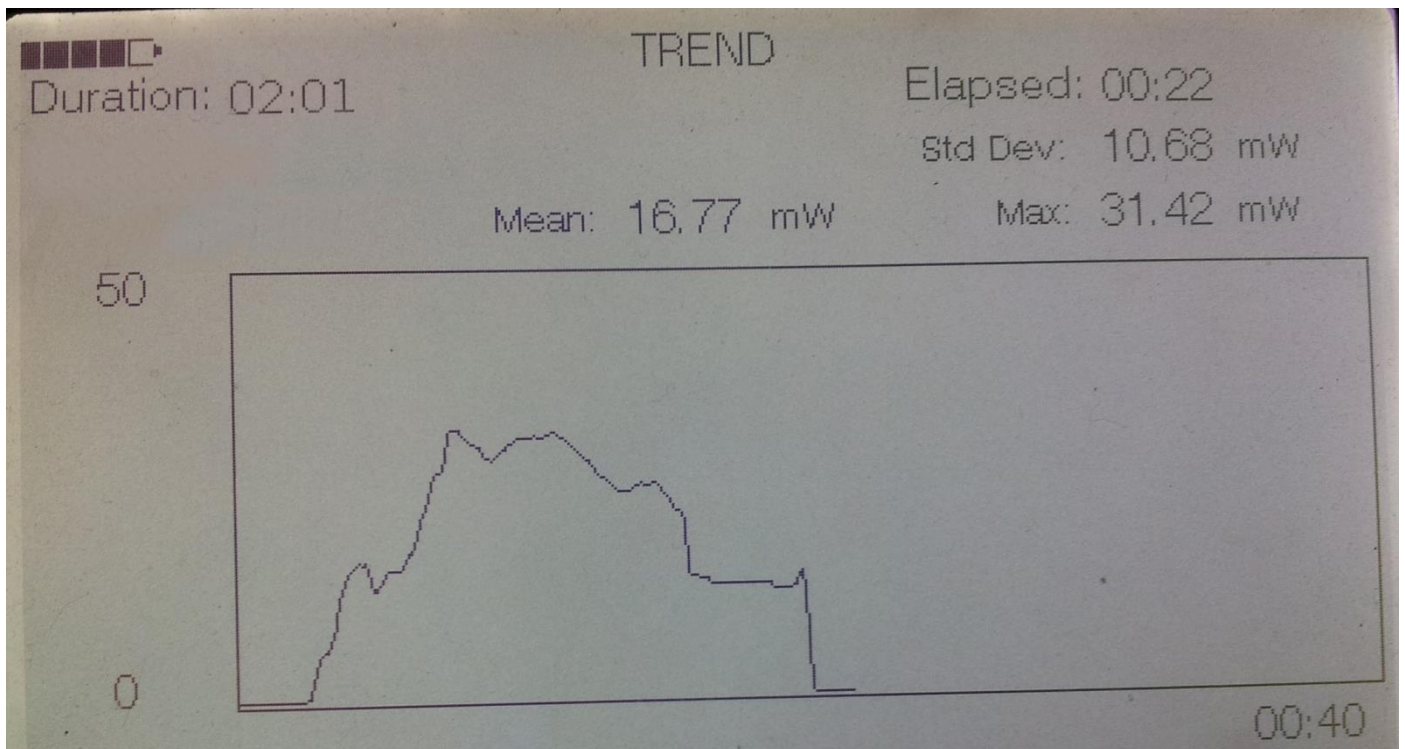
A avaliação da potência foi realizada com Power meter, modelo LabMax_TOP fabricado pela Coherent, e o sensor LM2-VIS, que mede até 50mW e comprimento de onda de 400nm até 1064nm, com área de 0,49 cm². O erro estimado para estas medidas é de \pm 10%.

Os seguintes passos foram adotados para realizar a medida de potência:

1. Power meter ajustado para o comprimento de onda de 450 nm e o offset zerado.
2. O sensor LM2-VIS foi colocado de frente a superfície e foi realizado uma varredura acompanhando a geometria do objeto medido e gerado um gráfico dessa varredura.



Podemos observar no gráfico abaixo a variação da intensidade luminosa conforme varremos a superfície.



Analisando o gráfico observamos uma intensidade um pouco baixa nas duas extremidades e aumentando relativamente no centro obtendo uma média de potência/intensidade luminosa de $16,77\text{mW} / 33,54\text{mW}/\text{cm}^2$.





APÊNDICE C

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa sobre redução de microorganismos na cavidade bucal. A sua participação não é obrigatória e a qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar o seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Quanto ao projeto de pesquisa:

O objetivo geral é a redução de microorganismos da cavidade bucal através da terapia fotodinâmica (TFD) em indivíduos portadores de aparelhos ortodônticos. Este projeto justifica-se pelo fato de procurar desenvolver meios que facilitem a descontaminação bucal com uma terapia antimicrobiana mais eficaz que as disponíveis no mercado e sem que haja a necessidade do uso de medicamentos sistêmicos, tais como antibióticos, com os quais a resistência microbiana a estes é uma realidade. Obtendo-se assim, uma terapia alternativa e eficaz para descontaminação bucal durante tratamento ortodôntico.

Não será utilizado nenhum procedimento invasivo. O tratamento consiste de um bochecho com solução manipulada contendo um agente fotossensibilizador (FS), Curcumina ou combinado com um agente surfactante, SDS. Logo em seguida, será aplicada a luz LED (diodo emissor de luz), de comprimento de onda adequado para ativar o FS, durante 3 minutos, de forma que o indivíduo colocará a ponta do dispositivo de luz na cavidade bucal e manterá a boca fechada nesse tempo. Para avaliar a contagem de microorganismos será necessário coletar a saliva do indivíduo em três momentos: antes da iluminação, imediatamente após a iluminação e 24 horas após a iluminação. A terapia acima descrita não oferece risco ao indivíduo por utilizar medicamentos já utilizados em pesquisas anteriores nas quais não causaram danos ao indivíduo. Porém, reações inesperadas podem acontecer devido à resposta particular do indivíduo ao medicamento, ou mesmo, quando administrada em concomitância com outras drogas. Diante destes riscos, pede-se ao indivíduo não ingerir nenhuma outra medicação 12 horas antes da aplicação da TFD.

Os benefícios esperados estão relacionados a descontaminação bucal pelo uso de uma técnica eficaz e segura, uma vez que praticamente não há efeito colateral quando usado os protocolos adequados e não promove resistência microbiana (como os antibióticos), além de se apresentar mais viável economicamente.

O fotossensibilizador que será utilizado no presente estudo, a Curcumina, apresentam coloração acastanhada em todas as concentrações porém, em testes já previamente realizados em tecidos duros dentais, demonstrou-se que não há manchamento dos dentes e de restaurações estéticas. Desta forma, em caso de pigmentação nessas estruturas, tal fenômeno é superficial sendo eliminado após escovação dental em poucas horas seguinte a terapia fotodinâmica.

A Curcumina (produto presente em temperos alimentícios) será inicialmente manipulada em etanol absoluto, porém em concentrações semelhantes aos enxaguatórios bucais comercialmente utilizados, não proporcionando riscos quanto a sensibilidade da mucosa bucal.

As fontes de luz utilizadas apresentam intensidade que podem causar danos oculares. Para evitar a exposição direta à luz, o indivíduo e operador utilizarão óculos de segurança apropriados a cada fonte de luz.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Assim, os resultados dos exames não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Não poderão participar desta terapia: portadores de doenças sistêmicas não-controladas; aqueles que fizeram tratamento sistêmico com antibióticos nos últimos 3 meses; e aqueles que fazem uso contínuo de algum tipo de colutório/ bochecho. Portanto, apresentando qualquer um dos itens acima o pesquisador deverá ser informado.

Se você tiver alguma dúvida, poderá requisitar dos pesquisadores esclarecimentos ao longo de toda a pesquisa.

As despesas com o tratamento serão arcadas pela pesquisa, sendo assim a terapia será oferecida gratuitamente. E ainda, não está previsto ressarcimento de despesas outras.

Caso haja qualquer problema durante a participação do indivíduo na pesquisa, o mesmo poderá contatar o pesquisador responsável, Dr. Vitor H. Panhóca, pelo telefone (16) 33739810 ramal 222.

Você receberá uma cópia (via) deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e a sua participação, agora ou a qualquer momento.

Vitor Hugo Panhóca (Doutorando sob supervisão do Prof. Dr. Vanderlei Bagnato)
 Av. Trabalhador São-carlense, 400 - Centro 13560-970 - São Carlos, SP
 Telefone: (16) 33739810-Ramal: 222

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Saúde, Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) em Brasília e pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP Brasil. Fone (16) 3351-8110. Endereço eletrônico: cephumanos@power.ufscar.br

São Carlos, SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura

Nome do Sujeito da Pesquisa: _____

Endereço: _____ Fone: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: OTIMIZAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS EM PACIENTES PORTADORES DE ACESSÓRIOS ORTODÔNTICOS.

Pesquisador: VITOR HUGO PANHÔCA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15086513.2.0000.5504

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO ((INSTITUTO DE FISICA DE SAO CARLOS))

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 258.461

Data da Relatoria: 14/05/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa de doutorado que envolve a participação de pessoas que possuem acessórios ortodônticos, que serão submetidas a um tratamento fotodinâmico (TFD) induzido por Curcumina e por diodo emissor de luz(LED). Tal tratamento estará sendo avaliado pelo pesquisador, a partir de um estudo experimental.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos do pesquisador são: "O objetivo primário está em analisar diferentes protocolos de aplicação da TFD obtendo resultados que alcancem diminuição da população de S mutans no meio bucal após avaliação por contagem de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). O objetivo secundário é avaliar o efeito do tratamento com TFD sobre S mutans encontrados em meio bucal, comparando os protocolos que utilizam a TFD com apenas urcumina como fotossensibilizador em um grupo experimental comparado a um grupo experimental tratado com TFD mais surfactante e tendo como grupo experimental controle positivo os indivíduos tratados apenas com clorexidina 0,2%. A clorexidina a 0,2% já é uma terapia consagrada na literatura até o presente momento como a melhor terapia para desinfecção bucal".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sobre os riscos, de acordo com o pesquisador: O uso da TFD em odontologia vem sendo

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9893

E-mail: cephumanos@ufscar.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR



Implementado na odontologia como mostrado em várias pesquisas e não há riscos para os pacientes, uma vez que se trata de uma fonte de luz aprovada pela ANVISA e pelo INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) para uso terapêutico em humanos, quando registrado que os sistemas a base de LEDs, desde que sob os mesmos parâmetros empregados com os sistemas lasers de baixa intensidade, podem resultar nos mesmos efeitos terapêuticos. A terapia fotodinâmica com uso de fotossensibilizadores respeitando os protocolos já relatados na literatura (DESIMONE, N.A.; CHRISTIANSEN, C; DORE, D. Bactericidal effect of 0.95-mW helium-neon and 5-mW Indium-gallium-aluminum-phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. Phys Ther 1999., v.79,n.11,p.1082,1999) apresenta resultados promissores sem riscos ao ser humano e promovendo o benefício de desinfecção da cavidade bucal. O fotossensibilizador usado, Curcumina, trata-se de uma substância natural amplamente usada na culinária Indiana e Nacional e em concentração de 1000mg/L apenas para bochecho (uso tópico) com supervisão do pesquisador não oferece riscos ao paciente. Porém, reações inesperadas podem acontecer devido à resposta particular do indivíduo ao medicamento, ou mesmo, quando administrada em concomitância com outras drogas. Diante destes riscos, pede-se ao paciente não ingerir nenhuma outra medicação 12 horas antes da aplicação da TFD. Sendo óbvio que deve-se evitar a deglutição do fotossensibilizador em grande quantidade que pode vir a trazer efeitos tóxicos desconhecidos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa bem justificada, proposta por pesquisadores com experiência na área e relevante dos pontos de vista científico e social.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta a folha de rosto preenchida e assinada e o TCLE.

Recomendações:

Vide conclusões.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SÃO CARLOS

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR



Considerações Finais a critério do CEP:

SÃO CARLOS, 29 de Abril de 2013

Assinado por:
Maria Isabel Ruiz Beretta
(Coordenador)

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SÃO CARLOS

Telefone: (16)3351-9883

E-mail: cep@ufscar.br